



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Efecto modulador del sulfuro de hidrógeno en el
metabolismo basal en *Cavia porcellus* (cuy) normales**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con
mención en Farmacología Experimental

AUTOR

César Gonzalo GÓMEZ HERREROS

ASESOR

Jorge Luis ARROYO ACEVEDO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Gómez C. Efecto modulador del sulfuro de hidrógeno en el metabolismo basal en *Cavia porcellus* (cuy) normales [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN FARMACOLOGÍA CON MENCIÓN EN FARMACOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

Siendo las 10:00 hrs. del 22 de setiembre del 2016 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. Víctor Izaguirre Pasquel e integrado por los siguientes miembros: Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (Asesor), Dra. Yadira Fernández Jeri, Mg. Ácela Inés Arnao Salas y la Mg. Karim Lizeth Jiménez Aliaga, para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **EFFECTO MODULADOR DEL SULFURO DE HIDRÓGENO EN EL METABOLISMO BASAL EN *Cavia porcellus* (CUY) NORMALES** presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **CÉSAR GONZALO GÓMEZ HERREROS**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

17 - Diecisiete (Muy bueno)


Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **CÉSAR GONZALO GÓMEZ HERREROS**, el Grado Académico de Magíster en **Farmacología con Mención en Farmacología Experimental**.

Siendo las 12 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 12 hrs. del 22 de setiembre 2016.


Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel (P.P., T.P. 20H)
Presidente


Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P.P., T.C.)
Miembro - Asesor


Dra. Yadira Fernández Jeri (P. Asoc. T.C.)
Miembro


Mg. Ácela Inés Arnao Salas
Miembro


Mg. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (P. Aux. T.C.)
Miembro

Observaciones:

DEDICATORIA

A mi familia: Mi madre, mis queridos hermanos.

Por su comprensión y apoyo en las muchas ausencias.

A mi padre.

Que desde el cielo guía mis pasos.

A los miembros del jurado por sus recomendaciones para la mejora del presente trabajo.

Presidente: Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel

Miembros: Mg. Acela Inés Arnao Salas

Mg. Karim Lizeth Jiménez Aliaga

Dra. Yadira Fernández Jeri

A mi profesor, asesor, el Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo

Por creer en mi proyecto y sus sabios consejos.

ÍNDICE

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación teórica	2
1.4 Justificación práctica	4
1.5 Hipótesis	4
1.5 Objetivos	5
1.5.1 Objetivo general	5
1.6.2 Objetivos específicos	5

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Marco filosófico	6
2.2 Antecedentes de la investigación	6
2.3 Bases teóricas	9
2.4 Definición de términos	15

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA 17

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación, análisis e interpretación de resultado	23
4.2. Discusión de resultados	29

CONCLUSIONES 33

RECOMENDACIONES 34

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 35

ANEXOS 40

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Consumo de O ₂ y producción de CO ₂ .	45
Cuadro 2. Medias de parámetros histológicos del corazón.	45
Cuadro 3. Medias de los parámetros histológicos del pulmón.	46
Cuadro 4. Medias de los parámetros histológicos del Riñón.	47
Cuadro 5. Comparaciones de las medias de la hemoglobina.	48
Cuadro 6. Tabla general de valores obtenidos de la experimentación.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del H ₂ S en los niveles de consumo de O ₂ en <i>Cavia P.</i>	24
Figura 2. Efecto del H ₂ S en los niveles de producción de CO ₂ en <i>Cavia P.</i>	25
Figura 3. Medias del estudio anatomopatológico del corazón.	26
Figura 4. Resultado del estudio anatomopatológico de los pulmones.	27
Figura 5. Resultado del estudio anatomopatológico de los riñones.	28
Figura 6. Comparación del valor medio de la hemoglobina, tres grupos.	29
Figura 7. Grupo Experimental, inicio de lectura de O ₂ y CO ₂ por 15 min.	49
Figura 8. Grupo Experimental, final de lectura de lectura de O ₂ y CO ₂ .	49
Figura 9. Grupo Control, inicio de lectura de los 15 minutos.	50
Figura 10. Grupo Control, final de lectura luego de 15 minutos.	50
Figura 11. Grupo Gold estándar, inicio de lectura de O ₂ y CO ₂ por 15 min.	51
Figura 12. Grupo Gold estándar, final de lectura de CO ₂ luego de 15 min.	51
Figura 13. Grupo Gold estándar, final de lectura de O ₂ luego de 15 minutos.	52
Figura 14. Concentración de H ₂ S a la exposición en cuyes.	52
Figura 15. Grupo Gold estándar, miocardio expuesto a sevoflurano.	53
Figura 16. Grupo Gold estándar, pericardio expuesto a sevoflurano.	53
Figura 17. Grupo Gold estándar, pericardio expuesto a sevoflurano.	54
Figura 18 Monitor y vaporizador de anestesia.	55
Figura 19. Camilla de cirugía de la Unidad de Cirugía Experimental del INSN.	55
Figura 20. Extracción de órganos.	56
Figura 21. Unidad de Cirugía Experimental del INSN.	57
Figura 22. Procedimiento para el grupo experimental.	58
Figura 23. Analizador de gases.	59
Figura 24. Síntesis de sulfuro de hidrógeno.	59
Figura 25. Detalle del matraz de fondo redondo.	60
Figura 26. Detalle del matraz kitasato.	61

Figura 27. Cámara de tratamiento de 38,4 litros.	61
Figura 28. Cámara en detalle.	62
Figura 29. Cámara de 15 litros.	62

RESUMEN

Introducción. La modulación de la demanda de oxígeno por parte de un órgano o tejido podría salvar la integridad o aminorar el daño celular. El sulfuro de hidrógeno (H_2S) postula como un modulador efectivo. Algunos estudios han regulado la apoptosis, la función mitocondrial, la presión arterial, el ritmo cardíaco. **Objetivos.** Evaluar el efecto modulador del H_2S a 80 ppm sobre el metabolismo basal en *Cavia porcellus* (cuy) normales. **Diseño.** Estudio cuasi-experimental, tres grupos ($n=7$): Control, experimental y gold estándar. **Instituciones.** Laboratorio de Farmacología Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, y Unidad de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú. **Material biológico.** Veintiún *Cavia porcellus* (cuy), hembras y machos de ocho semanas con 250 ± 20 g de peso corporal. **Intervenciones.** 1) Control (exposición a aire limpio); 2) Experimental (exposición gaseosa de H_2S a 80 ± 20 ppm); 3) Gold estándar (exposición a 1.5% de sevoflurano). Los animales fueron introducidos en una cámara hermética, donde fueron nebulizados por veinte minutos; luego se cuantificó el consumo de oxígeno (O_2) y la producción de dióxido de carbono (CO_2), se les extrajo sangre, se les retiró el corazón, pulmón y riñones para estudio histopatológico. **Resultados.** El consumo de O_2 y la producción de CO_2 disminuyeron en referencia al control y gold estándar. Los tejidos cardíacos no mostraron alteraciones ($p > 0,05$). **Conclusión.** La administración por vía inhalatoria del H_2S a 80 ± 20 ppm es modulador del metabolismo basal en *Cavia porcellus* (cuy) normales.

Palabras clave: Metabolismo basal, sulfuro de hidrógeno, sevoflurano, *Cavia porcellus*.

ABSTRACT

Introduction. Modulation of oxygen demand by an organ or tissue could save the integrity or minimize cell damage. Hydrogen sulfide (H_2S) postulated as an effective modulator. Some studies have regulated apoptosis, mitochondrial function, blood pressure, heart rate. **Objectives.** To evaluate the modulatory effect of H_2S to 80 ppm on the normal basal metabolism in *Cavia porcellus* (guinea pig) normal. **Design.** Quasi-experimental study, three groups ($n = 7$): control, experimental and gold standard. **Institutions.** Laboratory of Pharmacology Faculty of Medicine UNMSM, Lima, Perú, and Experimental Surgery Unit of the National Institute of Child Health, Lima, Perú. **Biological material.** Twenty-one *Cavia porcellus* (guinea pig), females and males eight weeks with 250 ± 20 g body weight. **Interventions.** 1) Control (clean air exposure); 2) Experimental (gaseous H_2S exposure to 80 ± 20 ppm); 3) Gold Standard (exposure to sevoflurane 1.5%). The animals were placed in a sealed chamber where they were nebulised for twenty minutes; consumption of oxygen (O_2) and the production of carbon dioxide (CO_2) was quantified, blood was drawn to measure hemoglobin and removed his hearts, lungs and kidneys for histopathology study. **Results.** Consumption of O_2 and CO_2 production decreased compared to control and gold standard. The cardiac tissues showed no changes ($p > 0,05$). **Conclusion.** H_2S at 80 ± 20 ppm is basal metabolism modulator in *Cavia porcellus* (guinea pig) normals.

Keywords: Basal metabolism, hydrogen sulfide, sevoflurane, *Cavia porcellus*.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

En situaciones de tensión, como el bajo suministro de oxígeno, se crean grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daño real en células/tejidos/organismos isquémicos. En estos casos, el suministro de oxígeno se reduce enormemente sin control de la demanda y el sistema de transporte de electrones se vuelve ineficiente (Blackstone et al. 2007).

Muchos estudios han demostrado que hay tres marcos de tiempo en la protección contra la lesión por isquemia y reperfusión (I/R): Antes del episodio isquémico (precondicionamiento isquémico), durante la isquemia (acondicionamiento isquémico), y en el inicio de la reperfusión (poscondicionamiento isquémico), Wu et al. (2015). Existe una necesidad urgente de desarrollar fármacos neuroprotectores seguros y eficaces que pueden proteger a las células en la penumbra, ya sea bajo condiciones de isquemia o hemorragia, por lo que la droga puede ser administrada inmediatamente después de su aparición y antes de la llegada a un hospital (Yuan, J. 2009). Por ahora el trasplante de órganos sólidos y de tejidos, ya sea solo o combinado, se está utilizando cada vez más para enfermedades complejas y de situaciones mucho más allá de lo que actualmente es considerado habitual, como el riñón, hígado, páncreas, corazón y pulmón (Simpson, P. 2012). El potencial del sulfuro de hidrógeno (H_2S) para inducir un estado hipometabólico, requisito indispensable, puede tener amplias implicaciones terapéuticas en la medicina del trauma y trasplante de órganos (Stein et al. 2012).

A la fecha, se han realizado varios modelos de estudios para preservar órganos principales como: corazón, riñón y pulmón, usando H_2S como gas o mediante un donador. Los resultados fueron controversiales por ser proinflamatorio en unos casos y antiinflamatorio en otros (Wu, C. 2013).

Diferentes modelos en animales de experimentación se están utilizando para estudiar los efectos del H_2S en sus tejidos y órganos, esta pequeñísima molécula ha abierto un nuevo campo en la investigación sobre la modulación orgánica, sin embargo, no se han realizado estudios en *Cavia porcellus* de la línea peruana.

1.2. Formulación del Problema

¿El sulfuro de hidrógeno es modulador del metabolismo basal en *Cavia porcellus* (cuy) normales?

Justificación teórica

Estudios realizados por Elrod et al. (2007) demostraron que el H_2S puede ser de gran valor en la citoprotección durante la evolución del infarto de miocardio, asimismo, la administración de H_2S o la modulación de la producción endógena puede ser beneficioso en los trastornos isquémicos. También demostraron que el H_2S , administrado en el momento de la perfusión, disminuye el tamaño del infarto y preserva la función del ventrículo izquierdo en un modelo in vivo. Sivarajah et al. (2009) han demostrado que el aumento de la formación de H_2S endógeno contribuye a limitar la lesión tisular en el miocardio en modelos animales. Asimismo, Meng et al. (2015) refieren su importancia en la fisiología y patología del sistema cardiovascular, reducción de la presión arterial, vasodilatación, cardioprotección e inhibición de la aterosclerosis.

Estudios realizados en ratones, tratados previamente con H_2S , experimentaron una disminución de la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca y la producción de dióxido de carbono (CO_2). Se asemejó a un estado similar a la hibernación, esto es la animación suspendida (Aslami et al. 2010). La hibernación logra una reducción importante de la necesidad de oxígeno (O_2) por parte de los tejidos, logrando así, por ejemplo que el miocardio reduzca los requerimientos de O_2 a un nivel suficiente para

satisfacer las necesidades de la reducida oxidación mitocondrial, asegurando la sobrevivencia del miocito (Koslowki et al., 2001).

Los efectos ventilatorios y metabólicos de la exposición a 60 ppm de H₂S y 10% de O₂ en roedores pequeños y grandes (ratones de 20g y ratas de 700g de peso), mostraron que la respuesta metabólica a la hipoxia difieren de acuerdo a la masa corporal (Haouzi et al. 2009). Por otra parte, el *Cavia porcellus* tiene 64 cromosomas (Walker et al. 2014) a diferencia de los roedores anteriormente mencionados que pueden llegar a tener hasta 48 cromosomas.

Investigaciones realizadas por Hu et al. (2010) en la enfermedad de Parkinson, inducida en ratas, han demostrado por primera vez que el H₂S puede servir como neuroprotector al tratar de prevenir la neurodegeneración inducida por neurotoxinas.

Investigaciones realizadas por Simon et al. (2011) en modelos de riñones dañados de porcinos demostraron que el sulfuro redujo la concentración de interleucinas 1 y 6 (IL- 1y IL- 6), factores que activan la actividad inflamatoria y proinflamatoria, los nitritos y nitratos en sangre (tóxicos y cancerígenos). Perry et al. (2013) demostraron que el H₂S exógeno inhibe la fosforilación de la quinasa-1/2 y p38, bajo concentraciones de 100μM, lo que podría representar un mecanismo por el cual el H₂S inhibe la proliferación y liberación del IL-8.

No se han evaluado las perturbaciones agudas del pulmón y de otros sistemas de órganos después de la exposición al H₂S (Stein et al. 2012).

El H₂S de producción endógena se considera ahora como el tercer miembro de una familia de transmisores gaseosos, junto con el óxido nítrico (NO) y de monóxido de carbono (CO) (Perry et al. 2013).

Los estudios realizados por Barr et al. (2015) sugieren que la terapia con H₂S puede ser de importancia clínica en el tratamiento de complicaciones cardiovasculares derivadas de la diabetes.

1.3. Justificación práctica

Brindar conocimiento sobre la manipulación y modulación de la demanda de oxígeno por parte de los tejidos vivos. Estos aportes van a tener aplicación desde el campo de la veterinaria como en la medicina humana, por ejemplo en una emergencia por falla orgánica sería útil. La técnica de preservación a bajas temperaturas daña las células, sería una alternativa como modulador metabólico.

1.5 Hipótesis

Hipótesis general

El metabolismo basal de *Cavia porcellus* (cuy) normales es modulado por el sulfuro de hidrógeno.

Hipótesis específicas

- El metabolismo basal de *Cavia porcellus* (cuy) normales disminuye por efecto de la exposición a sulfuro de hidrógeno.
- Sulfuro de hidrógeno es un agente depresor del metabolismo basal de *Cavia porcellus* (cuy) normales.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del sulfuro de hidrógeno como modulador del metabolismo basal de *Cavia porcellus* normales.

1.6.2. Objetivos específicos

- Medir el consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono del *Cavia porcellus* (cuy) normales inmediatamente antes y después de la exposición al sulfuro de hidrógeno.
- Determinar los cambios histológicos a nivel de tejido pulmonar, cardíaco y renal en *Cavia porcellus* (cuy) normales después de la exposición al sulfuro de hidrógeno.
- Determinar los niveles de hemoglobina entre los grupos experimentales (control, experimental y gold estándar).

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico

La concepción filosófica de la presente investigación corresponde a la positivista, porque se ha aplicado el método científico para arribar a las conclusiones como producto del proceso investigativo; el enfoque que se tuvo en cuenta fue el cuantitativo.

Blackstone et al. (2007) cita a Joseph Priestley“observó una elevada velocidad de combustión de las velas en oxígeno puro, y se preguntó si la gente viviría demasiado rápido si estuviéramos en el mismo entorno de las velas”. Se postuló que el sulfuro, un reductor natural del oxígeno que se produce en muchos tipos de células, actúa como un amortiguador para evitar el consumo de oxígeno sin restricciones. Teniendo en cuenta lo mencionado, para demostrar el efecto modulador del H₂S sobre el metabolismo basal, se empleó el método científico experimental cuantitativo, razonamiento lógico-deductivo, en el cual las observaciones fueron traducidas a números.

2.2. Antecedentes de la investigación

Blackstone et al. (2007) publicaron: “Suspended animation-like state protects mice from lethal hipoxia”, fue el primer trabajo de su tipo en donde usaron el H₂S como modulador. Usaron como material biológico ratones machos y hembras; como material instrumental usaron medidores de flujo másico digitales, un monitor de gases portátil para medir CO₂ y O₂. El sulfuro fue administrado en forma de H₂S. Para los análisis estadísticos usaron la prueba t de Student de Microsoft Excel. Demostraron que el H₂S redujo la tasa metabólica de los ratones en aproximadamente 90% e indujo a un estado de animación suspendida.

Elrod et al. (2007) en sus investigaciones titulada: “Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function”, estudiaron el daño causado por una reperfusión isquémica cardiaca que fue salvada por la preservación de la función

mitocondrial. El H_2S , producido endógenamente por la sobreexpresión específica de cistationina γ -liasa en el corazón, limita de manera significativa el alcance de la lesión en una isquemia miocárdica. Usaron como material biológico ratones masculinos C57BL6/J de 8 semanas de edad. Para detectar la isquemia usaron colorante azul de Evans (1 ml de una solución al 5%) que se inyectó, mediante un catéter, en la arteria carótida para delinear la zona isquémica de la zona no isquémica. El corazón se extirpó rápidamente y fue transversalmente seccionado en 1 mm de espesor, que a continuación se incubaron en 1,0% de cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio para demarcar el miocardio viable y no viable dentro de la zona de riesgo. Las áreas de infarto, de riesgo, y zona no isquémica del ventrículo izquierdo fueron evaluadas por una planimetría asistida por computador. La presión arterial y el ritmo cardíaco fueron medidos mediante técnicas de radiotelemedría. El consumo de O_2 por las mitocondrias cardiacas se midió en una cámara sellada multicanal agitada magnéticamente a 37 °C utilizando electrodos calibrados de tipo Clark conectados a un amplificador. Para medir la concentración de H_2S se usó un analizador multicanal. Las investigaciones concluyeron que el H_2S actúa como un amortiguador de una falla cardiaca, disminuyendo el tamaño del infarto y preservando la función del ventrículo izquierdo en un modelo in vivo de una isquemia/reperfusión miocárdica.

El trabajo realizado por Kubo et al. (2007): “Hydrogen Sulfide Causes Relaxation in Mouse Bronchial Smooth Muscle”, demostraron que el H_2S causaba relajamiento de la musculatura lisa bronquial del ratón y del cobayo, al analizarla tensión de los anillos bronquiales. La preparación se hizo con carbacol y sulfhidrido de sodio (NaHS). La tensión isométrica se registró a través de un transductor de fuerza-desplazamiento. Concluyeron que el H_2S actúa como un broncodilatador en ratones. Lograron reducir el metabolismo como la producción de CO_2 , lo que permitió una frecuencia respiratoria inferior, mientras se mantenía un adecuado intercambio gaseoso.

Aslami et al. (2010) en su trabajo: “Suspended animation inducer hydrogen sulfide is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury”, estudiaron el papel protector del H_2S en el tejido pulmonar de los ratones

ante una lesión que induce la asistencia ventilatoria mecánica. El objetivo era demostrar que un estado de animación suspendida inducida por el H_2S protege contra la lesión de órganos inducida por hipoxia. Se usaron ratas macho Sprague-Dawley (350 g); recibieron una inyección intraperitoneal de la mezcla de anestesia (0,15 ml /100 g de peso corporal) que contenía 90 mg/kg de ketamina, 0,5 mg/kg de medetomidina, y 0,05 mg/kg de atropina. El monitoreo hemodinámico fue hecho por un catéter en la arteria carótida conectado a un sensor. El flujo aórtico se midió mediante la inserción de una sonda de flujo, en torno a la aorta ascendente después de la toracotomía. Se realizó el análisis de gases en sangre arterial por hora. Se midió la temperatura rectal, la que se mantuvo a 37°C. Concluyeron que el NaHS, un donador de H_2S , induce un estado hipometabólico reversible en ratas anestesiadas y protege contra la lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica al reducir la inflamación pulmonar, un efecto que fue parcialmente independiente de la temperatura corporal.

Li et al. (2012) en su trabajo titulado: "Is Hydrogen Sulfide-Induced Suspended Animation General Anesthesia?", compararon los anestésicos existentes con las propiedades del H_2S , ya que tienen similar mecanismo de acción. El material biológico usado fueron ratones machos C57BL/6, con edades de entre 2 a 3 meses. Las concentraciones de los vapores anestésicos fueron calibradas y controladas por un monitor. Los estudios concluyeron claramente la falta del carácter anestésico general del H_2S .

Snijder et al. (2014) en sus trabajos de investigación titulado: "Exogenous administration of thiosulfate, a donor of hydrogen sulfide, attenuates angiotensin II-induced heart disease in rats", investigaron las propiedades cardioprotectoras del H_2S mediante tiosulfato de sodio (STS) y el hidrosulfuro de sodio (NaHS) en ratones. Usaron una infusión de angiotensina II para inducir hipertensión, para el control usaron solución salina (NaCl). La experimentación fue realizada durante tres semanas al término de las cuales se llegó a la conclusión, de acuerdo a los resultados, de que tanto el NaSH y el STS impidieron el desarrollo de la hipertensión. Además, el grado de hipertrofia cardíaca, el grado de fibrosis histológica en

combinación con la expresión de genes profibróticos y los niveles de estrés oxidativo se redujeron todos significativamente.

Zhou et al. (2015) en su investigación titulada: “Antioxidant Effects of Hydrogen Sulfide on Left Ventricular Remodeling in Smoking Rats Are Mediated via PI3K/Akt-Dependent Activation of Nrf2”, estudiaron los efectos antioxidantes del sulfuro de hidrógeno sobre el ventrículo izquierdo remodelado en ratas fumadoras. Se utilizó NaHS (un donante de H_2S) que fue administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 14 $mmol/kg/día$, las ratas fueron expuestas al humo de cigarrillo durante 4 meses. Luego, mediante ecografía de 2 dimensiones, se evaluaron la estructura y función cardíaca. El estrés oxidativo se determinó mediante la medición de malondialdehído, superóxido de dismutasa, la actividad de glutatión peroxidasa y la generación de ROS en el miocardio. Concluyeron que el H_2S protege contra la remodelación del ventrículo izquierdo en ratas fumadoras a través de la atenuación del estrés oxidativo.

Miao et al. (2016) en sus investigaciones titulada: “Hydrogen Sulfide Recruits Macrophage Migration by Integrin $\beta 1$ -Src-FAK/Pyk2-Rac Pathway in Myocardial Infarction”, estudiaron la influencia que tiene el H_2S exógeno, mediante un donador (NaSH), en la migración de los macrófagos luego de un infarto al miocardio (IM), el estudio fue realizado in vitro luego de realizar un modelo de IM mediante la ligadura de la arteria coronaria izquierda. Luego de realizar los cortes y cultivos respectivos tanto en tejidos cardíacos normales y CES-knockout, se llegó a la conclusión que el tratamiento con H_2S ejerce un aumento de la infiltración de macrófagos en el miocardio infartado.

2.3. Bases Teóricas

Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gas incoloro e inflamable. Tiene un peso molecular de 34,08 y su densidad de vapor es de 1,19, más pesado que el aire ($d = 1.0$). Su olor es característico a huevos podridos o como el olor

desagradable de un desagüe bloqueado. El H_2S en el ambiente proviene de dos fuentes diferentes: fuentes orgánicas, incluyen bacterias y la descomposición de materias orgánicas tales como tanques sépticos liberado de alcantarillas o del agua de plantas de tratamiento; las fuentes inorgánicas son el gas natural, fabricación de rayón, papel y planta industriales de celulosa, depósitos de azufre, y gases volcánicos.

La vida media de H_2S en el aire varía desde 12 hasta 37 horas. La presencia de contaminantes fotoactivos en el ambiente y la variación de la temperatura cambiaría la vida media de H_2S . En el invierno, por ejemplo, la vida media de H_2S puede ser prolongada durante 37 h en aire muy frío y seco. La temperatura también afecta a la solubilidad del H_2S . A temperatura ambiente (20°C), un gramo de H_2S se disuelve en 242 ml de H_2O . La elevación de la temperatura aumenta la solubilidad del H_2S . A través del tiempo, la solución H_2S se convertiría turbia debido a la precipitación de azufre elemental. Esto refleja la oxidación del H_2S en la solución. El H_2S es una molécula altamente lipofílica. El H_2S penetra fácilmente en la bicapa lipídica de la membrana celular. Sin embargo, el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) son más permeables que el H_2S debido a una mayor propiedad lipofílica (Wang et al. 2012).

El H_2S es fácilmente soluble en agua y a pH fisiológico, alrededor de dos tercios, existe como ion sulfuro de hidrógeno (HS^-) y un tercio como H_2S no disociado. Utilizamos el término genérico de "sulfuro" para referirnos a ambas especies. El sulfuro es un transmisor de señal endógena a través de sulfhidración de proteínas y a baja concentraciones intracelulares—0,01 a 1 μM —dona electrones al complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, de ese modo estimula la producción de ATP. A concentraciones mayores de 3 a 30 veces, el sulfuro se vuelve tóxico mediante la unión e inhibición de citocromo C oxidasa en el complejo IV de la cadena de transporte de electrones, el último complejo de la cadena de antes de la síntesis de ATP por el complejo V (Jiang, et al 2016).

Sulfuro de hidrógeno como modulador

A bajas concentraciones, sirve como un donador de electrones fisiológico y como una fuente inorgánica de energía en las células de mamíferos; a través de estas vías, el H_2S actúa como una vía alternativa del transporte electrónico mitocondrial y de la generación de ATP (Szczesny et al. 2014).

Qabazard et al. (2014) establecen que afecta el metabolismo celular. Wang, R. (2012) en su amplio trabajo de revisión, afirma que un estado hipometabólico podría optimizar el equilibrio entre el suministro de oxígeno y su demanda a través del efecto de H_2S en base a las moléculas que participa en el metabolismo energético. El H_2S es un inhibidor reversible de la citocromo c oxidasa. La inhibición de la citocromo c oxidasa puede frenar la demanda de oxígeno por el animal y hacer que sea menos dependiente del suministro. En situaciones de estrés, como el bajo suministro de oxígeno, si la reducción de la oferta es precedida por la supresión de la demanda tales como el tratamiento previo con H_2S , las especies reactivas al oxígeno no deben ser generadas en demasía y el daño celular debe ser atenuado.

Efecto fisiológico del sulfuro de hidrógeno a nivel

- Cardíaco:

El descubrimiento de CES en el corazón de ratas así como la identificación de H_2S como un importante modulador es un gran avance en la investigación del papel que juega el H_2S en la función del corazón. Crecientes evidencias han demostrado que si se altera la producción de H_2S es relevante para las enfermedades del corazón. En pacientes clínicos, se han encontrado niveles de H_2S en plasma que redujeron significativamente las enfermedades coronarias en comparación con la de los sujetos control, angiográficamente normales. En pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) había marcadas reducciones en los niveles circulantes de H_2S a comparación de los controles. En modelos experimentales, los estudios también muestran que la producción endógena de H_2S es significativamente reducida en muchas enfermedades del corazón. Estos hallazgos implican que la enfermedad cardíaca puede poner en peligro la síntesis endógena de

H₂S, lo que puede agravar el estado de la enfermedad. Mientras tanto, estos resultados son una clara evidencia por la cual apoyar la participación de H₂S endógeno en el mantenimiento de las funciones fisiológicas basales del corazón (Shen et al. 2015).

- **Pulmonar:**

El H₂S en suero se correlacionó positivamente con la función pulmonar con una tasa de flujo espiratorio e inspiratorio máximo mejorada. El H₂S también aumentó la citoquina antiinflamatoria (interleucina-10) y la disminución de citoquinas pro-inflamatorias (interleucina-1-beta (IL1β)) en un modelo de lesión aguda pulmonar en murino, inducido por humo. Otros estudios han demostrado que el H₂S aumenta citoquinas pro-inflamatorias (IL-1β, IL-6, TNF). Algunos autores argumentan que los efectos de la inflamación producidos por H₂S dependen del tipo de donantes de H₂S. Los donantes de H₂S de liberación lenta son antiinflamatorios; los donantes de liberación rápida H₂S son pro-inflamatorias. Debido a las discrepancias en la literatura, no es posible concluir si el gas es pro o anti-inflamatoria. Sin embargo, sus propiedades anti-inflamatorias parecen ser más beneficiosas en enfermedades pulmonares (Wu, 2013).

- **Renal:**

El H₂S se produce en el riñón por las acciones combinadas de cistationina β-sintasa y cistationina γ-liasa, presentes principalmente en el túbulo proximal, está presente también el 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase. El H₂S afecta el túbulo renal y la vasculatura. La administración simultánea de ácido aminooxiacético, un inhibidor de cistationina β-sintasa, y propargilglicina, un inhibidor de la cistationina γ-liasa, pero tampoco de forma independiente, disminuye la tasa de filtración glomerular y la excreción de sodio y potasio, mientras que estos se incrementan mediante la infusión de ya sea de H₂S o de cisteína. De hecho, el H₂S inyectado en la arteria renal aumenta el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular, y por lo tanto es diurético, natriurético y kaliurético. Estos datos sobre el flujo de plasma renal y la tasa de filtración glomerular indican que el H₂S produce una mayor vasodilatación en las arteriolas preglomerulares que en las arteriolas postglomerulares. En

otro estudio, sin embargo, ratas tratadas crónicamente con ácido aminooxiacético y propargilglicina por 4 semanas mostraron un aumento de la presión arterial, pero la tasa de filtración glomerular no fue alterada, mientras que el flujo sanguíneo renal se redujo, el flujo de orina y la excreción de sodio también aumentó, el flujo sanguíneo cortical y medular se redujo. Estos experimentos indican que se registraron reducciones proporcionales de las resistencias vasculares tanto en arteriolas aferentes y eferentes. Por lo tanto, una deficiencia crónica de H_2S parece causar un aumento en la resistencia vascular que conduce a la vasoconstricción renal e hipertensión sistémica (Perna et al. 2012).

Bioquímica del sulfuro de hidrógeno o producción endógena

El H_2S endógeno es generado en células de mamíferos tanto por vías enzimáticas y como no enzimática, aunque la vía no enzimática es menos importante en la producción de H_2S . Con respecto a la vía enzimática, la cistationina β -sintasa (CBS) y la cistationina γ -liasa (CSE) son dos enzimas piridoxal-5'-fosfato- (PLP-) dependientes que utilizan ya sea únicamente L-cisteína o L-cisteína con homocisteína, principales sustratos para producir H_2S . A diferencia de la CBS y CSE, la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST) es una enzima PLP- independiente, que utiliza 3-mercaptopiruvato (3MP) como un sustrato para producir H_2S . El 3MP es un metabolito de la L-cisteína y el α -cetoglutarato de la cisteína aminotransferasa (CAT) (Wu et al. 2015).

Mecanismo de acción del sulfuro de hidrógeno

Para Li et al. (2012) el mecanismo de acción principal del H_2S es la inhibición del complejo IV de la cadena de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias

Gade et al. (2013) afirma que varios estudios han demostrado que el H_2S dilata los vasos sanguíneos tanto in vitro como in vivo mediante un mecanismo que implica la apertura de canales de potasio sensitivos a ATP (K_{ATP}).

La CBS regula la microcirculación cerebral, y en ratones-CBS deficientes muestran una reducción o vasodilatación ausente en las arteriolas precapilares en respuesta a la hipoxia, mientras que la deficiencia CSE no tiene ningún efecto. La CSE y CBS responden al estrés oxidativo, con el CSE - / -, los animales son más susceptibles al daño isquémico. Esta una protección que parece estar relacionado con la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por H_2S . Una de las propiedades más notables de H_2S es el sulhidración de proteínas y la modificación de su actividad. Esta modificación de la proteína después de la traducción, donde se añade un grupo SH a un residuo de cisteína reactiva, puede alterar la actividad de la proteína diana. Otro mecanismo interesante es la translocación intracelular para modificar la función de las proteínas. La CSE puede ser translocada a la mitocondria, lo que podría afectar su funcionamiento. Este proceso está regulado por la translocasa de la membrana externa 20 kDa (Tom20) (Fu et al., 2012). Cuando este proceso pueda ser regulado, conduciría a nuevas terapias para modular la función del CSE. La SUMOilación (SUMO del inglés: small ubiquitin-like modifier) en CBS también ha demostrado que disminuye su actividad (Bos et al. 2015).

Las revisiones realizadas por Polhemus et al. (2014) establecen que un mecanismo importante del H_2S es la de promover la translocación del factor de transcripción nuclear, Nrf2, desde el citosol al núcleo resultando en la expresión subsiguiente de numerosos genes desintoxicantes tales como hemo oxigenasa 1 (HO-1), superóxido dismutasa y catalasa.

Metabolismo basal, metabolismo basal en el cuy

El metabolismo basal es la cantidad de energía utilizada por el organismo en condiciones de reposo físico y mental para el mantenimiento de las funciones vitales. Involucra la respiración, la circulación sanguínea, el tono muscular, la filtración glomerular, la temperatura corporal.

En el cuy las temperaturas que excedan los 32°C se han relacionado con hipertermia y muerte, sobre todo en cuyes preñadas. No responden bien a condiciones extremas de humedad fuera del rango de 30 a 70%. El libro publicado por Wagner et al. (1976) establece que la temperatura corporal

(termómetro rectal) es de 38,3-40°C; el pulso: 230-320/minuto; la tasa respiratoria: 90-150/minuto. Ron Banks (1989) indica también que el cuy tiene una presión arterial sistólica rara vez mayor a 100 mmHg y que el electro cardiograma (ECG) es similar a la humana.

Indicadores del metabolismo basal

Indicadores del metabolismo basal son: El consumo de oxígeno, producción de dióxido de carbono, temperatura corporal, frecuencia cardíaca y presión arterial (Aslami et al. 2010) (Li et al. 2012).

Modelos de estudio del metabolismo basal: in vitro e in vivo

En los estudios in vitro el modelo usado es la hipoxia, se usa alguno de los siguientes compuestos para producirlo: Cloruro de cobalto (CoCl_2), sulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En este tipo de modelo se ha visto que el NaSH, un donador de H_2S , atenúa el daño celular. Otro modelo in vitro es de la ligadura de la arteria coronaria

En los estudios in vivo el principal modelo usado es del infarto al miocardio (IM), también se usa DL-propargilglicine para inhibir la CES. En los riñones la lesión isquemia/reperfusión (IRI) renal; la lesión hepática asociada a una IRI renal (llamada disfunción distante); oclusión renal aórtica (usada en porcinos); en el cerebro la oclusión bilateral de la carótida común; modelo de paro cardíaco y reanimación cardiopulmonar (CA/RCP) en ratones; modelo de hipoxia a cuerpo completo (Bos et al. 2015); modelo de lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica, Aslami et al. (2010); modelo de daño renal inducido por cisplatino, Coletta et al. (2010); modelo de fumador pasivo en ratas, Zhou et al. (2015).

2.4 Definición de Términos

Animación suspendida.- Ralentización de los procesos vitales, tales como la respiración, los latidos cardíacos, disminución del calor corporal, etc.

Apoptosis.- Muerte celular programada, pero también funciona para destruir sustancias orgánicas inservibles, las cuales el cuerpo no las necesita

Galena.- Es la principal mena de plomo, pero se encuentra en gran porcentaje también sulfuro y en menor medida otros minerales.

Isquemia/reperfusión.- Es la privación de flujo sanguíneo a un órgano (isquemia) y su posterior restablecimiento (reperfusión).

Metabolismo basal.- Cantidad de energía utilizada por el organismo en condiciones de reposo físico y mental para el mantenimiento de sus funciones vitales. Involucra la respiración, la circulación sanguínea, el tono muscular, la filtración glomerular, la temperatura corporal.

Sulfuro de Hidrógeno (H₂S).- Gas incoloro, inflamable y extremadamente peligroso. Tiene un olor a “huevo podrido”. Se encuentra en el petróleo crudo y gas natural.

Tasa metabólica.- Es la velocidad a la que un organismo utiliza la energía disponible.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

La investigación es de tipo cuasi experimental. Se manipularon las concentraciones de sulfuro de hidrógeno y sevoflurano, y se analizaron los resultados sobre el metabolismo basal. El estudio es prospectivo porque se recoge una variable después de iniciar el estudio; es analítico porque analiza las determinantes o causas de las variaciones; es longitudinal porque se van a recoger datos al iniciar y finalizar la experimentación.

3.2 Unidad de análisis

Cavia porcellus (cuy) normales (machos y hembras)

3.3 Tamaño de muestra

Veintiún *Cavia porcellus* (cuy) normales que fueron divididos en tres grupos de siete animales cada uno ($n=7$).

3.4 Selección de muestra

Veintiún *Cavia porcellus* (cuy) normales, hembras y machos, adquiridos del Instituto Nacional de Salud (INS) con pesos de entre 230-270 g fueron usados en la experimentación, las edades promedio fueron de 2 meses y 15 días.

3.5 Técnica de recolección de datos

Se usó la técnica de la observación y de registro de los resultados que arrojaban los analizadores de gases (ver figura 7-13 en anexos), piedra angular de la experimentación.

Tratamiento: Diseño experimental

1. Determinación del consumo de O₂ y producción de CO₂ en *Cavia porcellus* (cuy) normales luego del tratamiento con H₂S, así como la de los otros dos grupos.

Animales de experimentación: 14 cuyes (grupo experimental y control) se aclimataron por 3 días en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM; estuvieron en jaulas convenientemente amplias a 25 °C de temperatura y 70% de humedad, tuvieron libre acceso a agua y alimentos con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Se les privó de agua y alimentos 6 horas antes de la experimentación.

Cámaras de polipropileno (PP) de diferente medida:

- Una cámara principal de 38,4 litros (ver figura 27 en anexos) con tres perforaciones de 1 cm de diámetro. Estas tres perforaciones fueron convenientemente realizadas: Primero, para administrar el H₂S o sevoflurano; la segunda, para la purga de esos gases y la tercera para introducir la cánula del analizador de gases en la cámara.
- La segunda cámara de 15 litros (ver figura 29 en anexos) se usó para medir el consumo de O₂ y CO₂. Esta cámara sólo tuvo una perforación que fue para introducir la cánula del analizador de gases.
- La cámara para el tratamiento con sevoflurano fue la misma cámara usada para la exposición a H₂S, es decir, la cámara de 38,4 litros (ver figura 19 en anexos).
- La tercera cámara de 10 litros fue para aislar, momentánea, a los cuyes hasta que la concentración del H₂S en la cámara principal alcanzara el rango requerido, es decir, 80 ppm. La tercera cámara no se usó para la exposición al sevoflurano, ya que el vaporizador de anestesia produce el porcentaje requerido de sevoflurano.

Síntesis de sulfuro de hidrógeno:(realizada en el laboratorio de Farmacología de la UNMSM)

- 24 horas antes de la experimentación se pulverizó 3 g de sulfuro de hierro (FeS), cantidad que fue vertida a un matraz de fondo redondo, luego se adicionó 15 ml de HCl 5 M, seguidamente se calentó ligeramente mediante un mechero (ver figura 24 en anexos). Esto se hace con la finalidad de empobrecer la mezcla y lograr un mejor manejo de la concentración.
- El mismo día de la experimentación se vuelve a calentar la mezcla ligeramente (ver figura 25 en anexos). El gas desprendido, H_2S , pasó a un matraz kitasato mediante una cánula conectada desde el matraz de fondo redondo.
- La regulación de la concentración del gas fue mediante el manejo de la llave de paso, conectada al matraz kitasato (ver figura 26 en anexos), y observando atentamente el conteo del analizador de gases hasta obtener 80 ppm de H_2S .

MÉTODO:

Tratamiento a cuerpo completo de los cuyes, todos a la vez, con H_2S a 80 \pm 20 ppm por 20 minutos en una cámara herméticamente cerrada (ver figura 14 en anexos), luego fueron trasladados, todos a la vez, a otra cámara herméticamente cerrada con la cantidad de oxígeno existente del aire limpio, se analiza la cantidad de O_2 consumido y de CO_2 producido mediante un analizador de gases, QRAE II (RAE SYSTEMS) proporcionado por Grecol Perú (ver figura 23 en anexos).

PROCEDIMIENTO:

- Los grupos fueron clasificados en tres:
Grupo control (GC); Grupo experimental (GE) y Grupo gold estándar (GS). Cada grupo estaba integrado por 5 hembras y 2 machos.
- Para el grupo experimental: Siete cuyes fueron introducidos en la cámara protectora de menor tamaño que la cámara principal. Las dos cámaras tenían tapas de cierre hermético.

- Se procedió a liberar el H_2S hasta llegar a una concentración de 80 ppm.
- Una vez estabilizada la concentración de H_2S a 80 ppm se procedió a liberar los cuyes de la cámara protectora.
- El analizador de gases midió las variaciones del H_2S las cuales se niveló al rango requerido por un tiempo de 20 minutos de exposición. Igual al tiempo usado por Blackstone et al. (2007).
- Una vez terminado los 20 minutos de exposición al gas se trasladó, inmediatamente, a los cuyes a otra cámara hermética de 15 litros de volumen con presencia de aire limpio y se procedió a medir el consumo de O_2 y la producción de CO_2 por 15 minutos.
- Se tomó nota de los datos que arrojó el analizador de gases.
- En el grupo control sólo se midió la cantidad consumida de O_2 y la producción de CO_2 en la cámara de 15 litros.
- Para el grupo gold estándar, experimentación realizada en la Unidad de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN), no hubo aclimatación, el mismo día se realizó la exposición al sevoflurano (ver figura 19 en anexos).
- Sevoflurano (Ultane®, ABBVIE) se administró durante 20 minutos a cuerpo completo a una concentración de 1,5%. Concentración producida por un vaporizador de anestesia Sigma Delta y medida por un monitor (ver figura 18 en anexos). El sevoflurano tiene similar mecanismo de acción al H_2S .
- Transcurrido 20 minutos se trasladaron, inmediatamente, los cuyes a la cámara de 15 litro por 15 minutos para medir el consumo de O_2 y producción de CO_2 . Monitorizados por un analizador de gases.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

GRUPO	PRE-TEST	VARIABLE INDEPENDIENTE	POST-TEST
GE	O ₂ - CO ₂	Sulfuro de hidrógeno	O ₂ - CO ₂ ; CPR1 ; Hb1
GC	O ₂ - CO ₂	No	O ₂ - CO ₂ ; CPR2 ; Hb2
GS	O ₂ - CO ₂	Sevoflurano	O ₂ - CO ₂ ; CPR3 ; Hb3

GE: grupo experimental; GC: grupo control; GS: grupo gold estándar; CPR: Estudio anatomopatológico de corazón, pulmón y riñón; Hb: Medición de la hemoglobina.

2. Estudios anatomopatológicos a nivel de tejido pulmonar, cardiaco y renal del *Cavia porcellus* (cuy) normales después de la exposición al H₂S en el grupo experimental comparándolo con el grupo control y el grupo gold estándar.

MÉTODO: Se practicó la eutanasia a los *Cavia porcellus* (cuy) para luego extraer los pulmones, el corazón y los riñones.

PROCEDIMIENTO:

- El procedimiento fue realizado lo más rápidamente posible, se practicó la eutanasia a los *Cavia porcellus* (cuy) con 3 mL de pentobarbital sódico la que se aplicó por vía intraperitoneal.
- Se levantó moderadamente la piel en la parte más inferior del abdomen con la ayuda de una pinza y se procedió a cortarla con una tijera de cirujano punta roma.
- Primero se extrajeron los dos riñones que están ubicados debajo de los intestinos cortando los tejidos que las sujetaban, ayudándose con una pinza.
- El corte de la piel del abdomen se hizo hasta casi llegar a la boca del *Cavia porcellus* (cuy), se ubicó la tráquea y se jaló para extraer conjuntamente el corazón con los pulmones.

- Los pulmones, corazón y riñones se conservaron en envases previamente preparados con formol diluido (1 de formol por 4 de agua destilada) para la conservación de los tejidos extraídos.
- Las observaciones de los cortes se realizaron en el Instituto de Patología de la UNMSM.

3. Cuantificación el nivel de hemoglobina del *Cavia porcellus* (cuy) normales después de la exposición al H₂S, así como en el grupo control y gold estándar.

Se realizó en la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM mediante la técnica de la cianometahemoglobina (Maxine, 1984), la cual se fundamenta en que el ferricianuro convierte el hierro de la hemoglobina del estado ferroso al férrico para formar metahemoglobina en una solución alcalina. La metahemoglobina se combina con el cianuro de potasio para producir el pigmento estable de cianometahemoglobina.

MÉTODO:

Para extraer la sangre del *Cavia porcellus* se usó la técnica de la punción cardiaca.

PROCEDIMIENTO

- En un vaso de precipitado de 250 ml se introdujo una cantidad generosa de algodón, que ocupó una tercera parte, luego fue empapada con éter etílico.
- Inmediatamente se tomó un *Cavia porcellus* y se le expuso a éter etílico, introduciendo su cabeza en el vaso de precipitado hasta que no mostrara movimiento aparente. Con el éter etílico se logra un mejor manejo en la fuerza de los latidos cardiacos del cuy, lográndose una mejor toma de muestra de volumen sanguíneo.
- Luego se buscó mediante el dedo pulgar, o índice, de la mano derecha el latido del corazón. Esta se ubica en la parte lateral izquierda media del tórax.

- Una vez ubicado el latido elevado del corazón se introdujo la aguja N° 23x1 hasta la mitad de su longitud.
- La sangre del corazón se denotó en el cono de la aguja, entonces es cuando se jaló el émbolo hasta extraer de 2 a 3 ml de sangre.
- Se retiró la aguja de la jeringa y la sangre se pasó, a velocidad moderada, a un tubo con EDTA para luego realizar movimientos suaves y mezclar la sangre con el anticoagulante, luego se refrigeró la muestra a 5-6 °C para su análisis de Hb.

Análisis estadísticos de datos

Los datos recolectados fueron llevados a una matriz en Microsoft Excel 2010, la variable consumo de O₂ residual fue expresado en porcentaje y la producción de CO₂ en media de ppm (partículas por millón), los grupos fueron comparados mediante el promedio de resultados del analizador de gases. Para el análisis de los tejidos, datos numéricos, se usó la prueba de Tukey, ya que su uso implica en un número elevado de comparaciones como son las distintas estructuras del pulmón, riñón y corazón. La prueba de Tukey también se usó para el cálculo de la media de la hemoglobina ya que implica un solo comparador. Se consideró un nivel de significancia fijado en $p < 0,05$. Se utilizó el programa estadístico SPSS 21.

Aspectos éticos

Se respetó los protocolos establecidos por el Comité de Ética de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para lograr el buen trato del animal de experimentación, además de tener en consideración la “Ley de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio” (Ley N° 27265).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación, análisis e interpretación de resultados

El consumo de oxígeno residual (O_2) y la producción de dióxido de carbono (CO_2) resultó diferente entre el grupo control, experimental y gold estándar. El grupo experimental, tratado con sulfuro de hidrógeno, consumió menor cantidad de oxígeno ya que empezó con un porcentaje de O_2 de 20,6% y terminó en 19,9%.

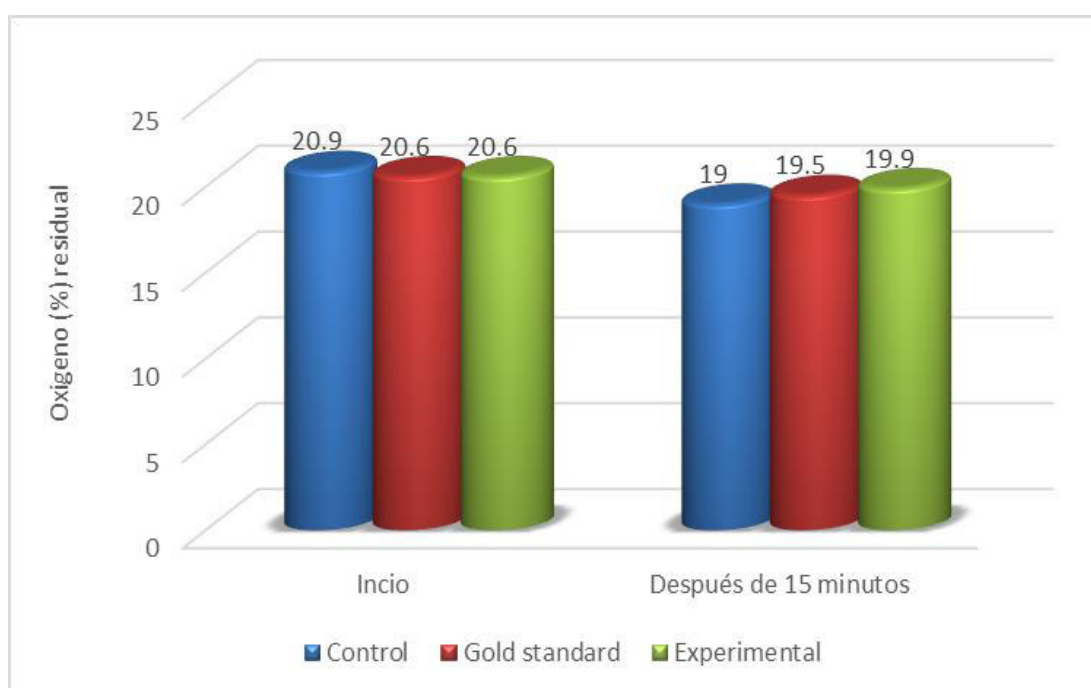


Figura 1. Efecto del sulfuro de hidrógeno en los niveles de consumo de oxígeno residual en *Cavia porcellus* (cuy) normales. Se observa que el grupo experimental, tratado con H_2S , consumió menor cantidad de oxígeno.

En la figura 1, todos los grupos empezaron con el mismo porcentaje de O_2 (20,6%), excepto el control (20,9%), tomando como referencia una cámara de 15 litros. El grupo control consumió mayor cantidad de O_2 a diferencia del gold estándar que fue menor; el grupo experimental consumió menor cantidad de O_2 en referencia al gold estándar. Así tenemos que el diferencial del consumo de O_2 del grupo control fue 1.9%; en el gold estándar fue 1.1%

y del grupo experimental fue 0.7%. Marcadamente inferior resultó el consumo de O₂ en el grupo experimental (sólo 0,7%), resultado de la modulación en la demanda.

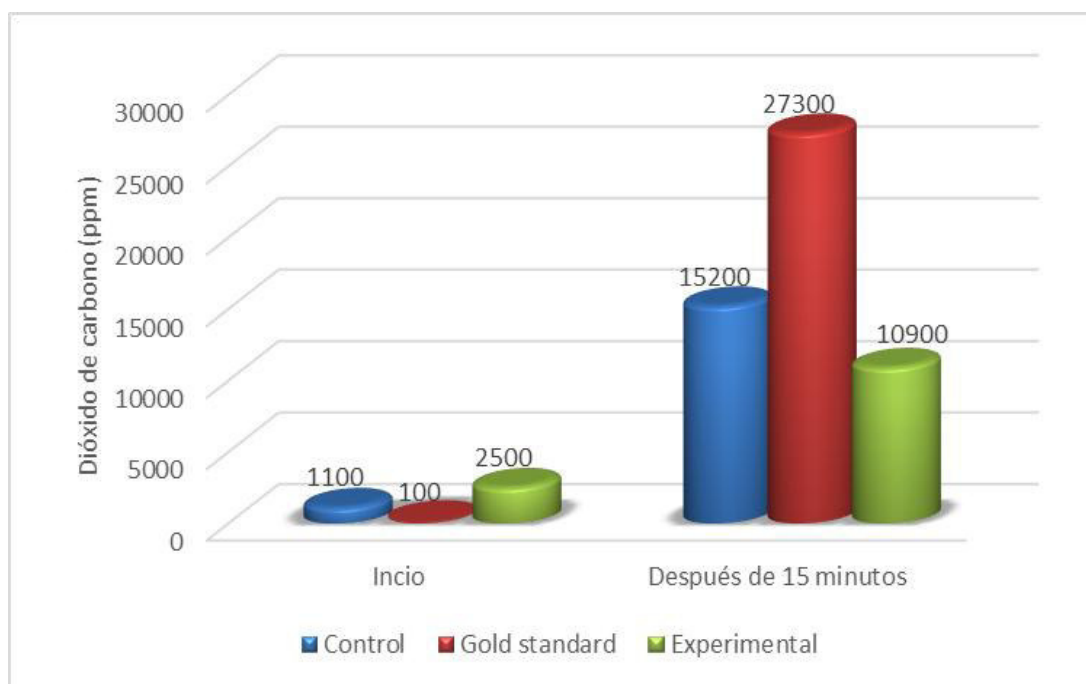


Figura 2. Efecto del sulfuro de hidrógeno en los niveles de producción de CO₂ (ppm) en *Cavia porcellus* (cuy) normales. Se observa que el grupo experimental, tratado con H₂S, produjo menor cantidad de CO₂.

En la figura 2 se aprecia que los resultados de la producción de CO₂ fueron muy variables. La producción de CO₂ en el grupo control fue 15200 ppm; en el grupo experimental fue de 10900 ppm y en el grupo del gold estándar: 27300 ppm, la elevada producción de CO₂ se debe, posiblemente, a la alta producción de carboxihemoglobina que se forma a la exposición de los anestésicos volátiles halogenados como el sevoflurano. Igualmente fue marcadamente inferior la producción de CO₂ en el grupo experimental debido a la modulación del metabolismo. Resulta ser inferior la producción de CO₂ en 4300 ppm respecto al grupo control o blanco (expuesto sólo a aire puro) y en 16400 respecto al gold estándar (expuesto a sevoflurano).

Los estudios anatomopatológico del corazón, pulmón y riñón no tuvieron mayores variaciones comparativas entre el grupo experimental y gold

estándar con respecto al control. Lo que si se debe resaltar que el *Cavia porcellus* del grupo experimental presentaron inalterados los tejidos cardiacos, a diferencia del gold estándar. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la parte estadística ($p>0,05$), lo que sugeriría que el sulfuro de hidrógeno no es dañino a las concentraciones usadas para el corazón del *Cavia porcellus*.

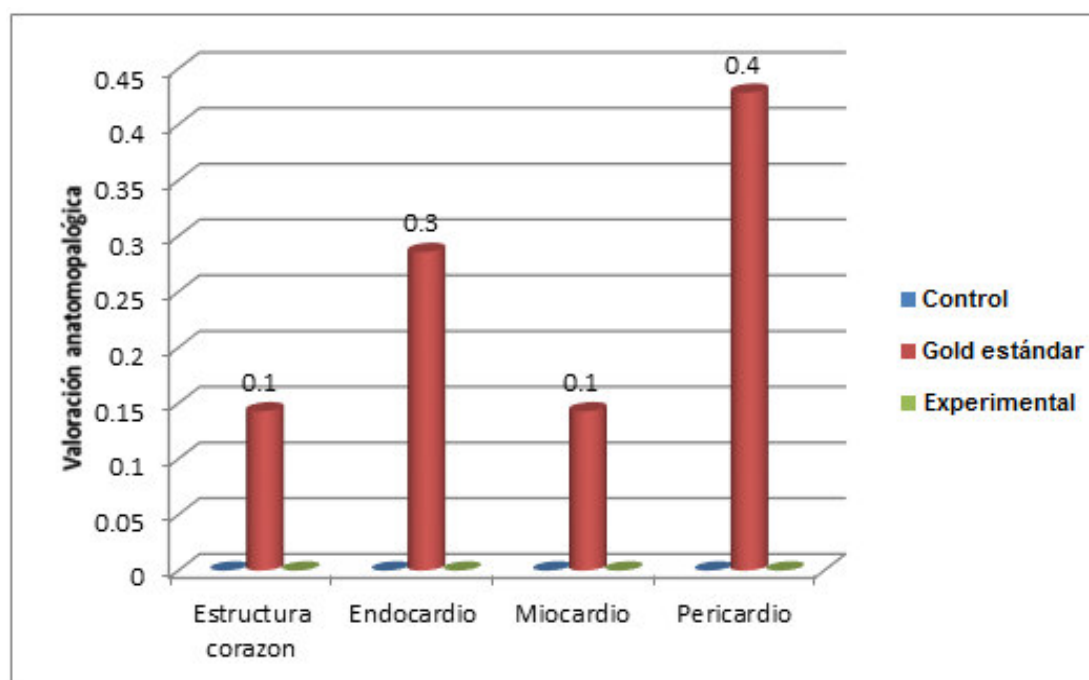


Figura 3. Medias del estudio anatomopatológico del corazón. De la valoración anatomopatológica, de 0 a 5, ningún resultado llega a la unidad, en consecuencia se considera como inalterado el tejido cardíaco en los tres grupos. $p>0,05$ ($n = 7$ por grupo).

En la figura 3 se observa la escala de mayor valoración, al estudio anatomopatológico, fue 0,4. Este valor representa a la mitad de la unidad que se considera como conservado. En las figuras 15, 16 y 17 (ver anexos), que pertenecen al tejido cardíaco grupo del gold estándar, son los únicos que mostraron alteraciones. Las flechas negras señalan esas alteraciones.

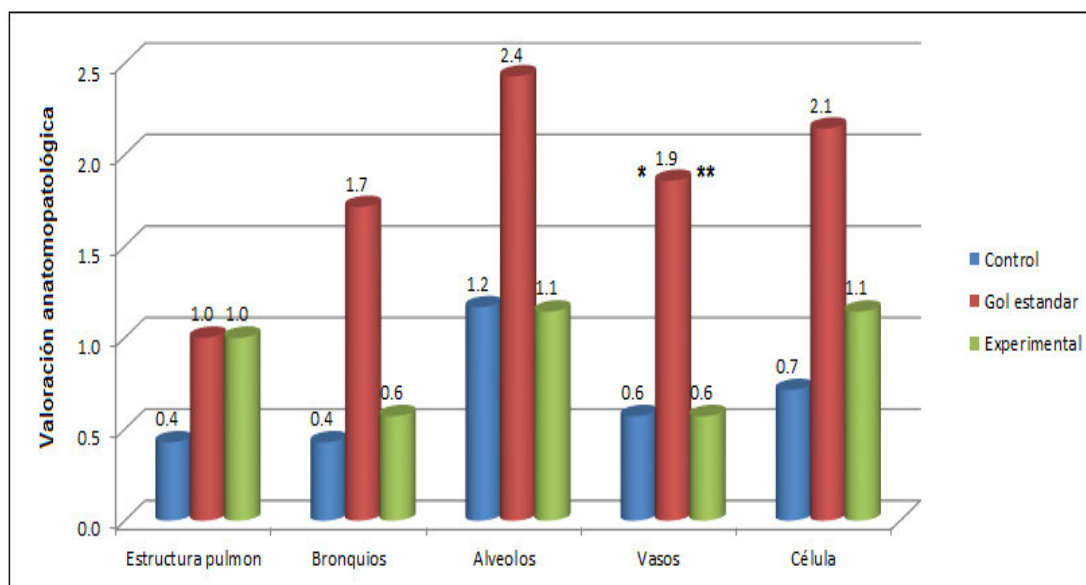


Figura 4. Resultado del estudio anatomopatológico en los pulmones. Donde la media es igual al promedio de lesiones por grupo, según niveles del órgano evaluado. Prueba de Tukey: *Control versus Gold estándar, $p < 0,05$; **gold estándar versus experimental, $p < 0,05$ ($n = 7$ por grupo).

Los resultados del estudio de los pulmones se aprecian en la figura 4. Se observan diferencias significativas en los vasos ($p < 0,05$), resultando menor la media del control en relación a la media del gold estándar. Asimismo se encontró que la media del grupo experimental es menor que la media del gold estándar.

En la figura 5 se aprecia que existen diferencias significativas en los túbulos e intersticio que evidencia cierta alteración en esas estructuras de los riñones en el grupo experimental. Se observa una menor media del control en relación a la media del gold estándar.

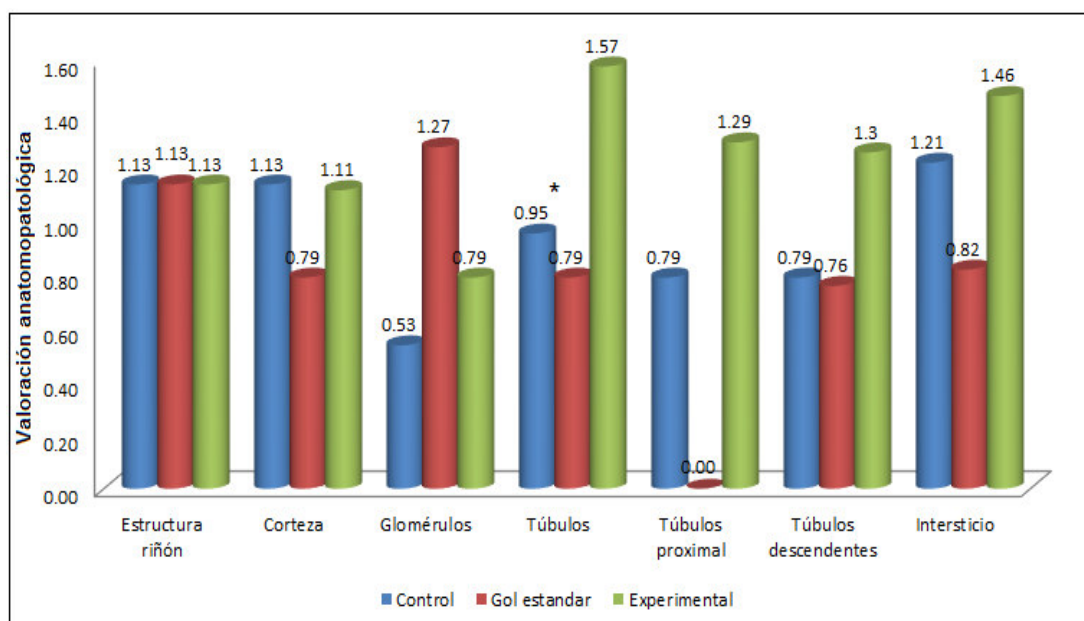


Figura 5. Resultado del estudio anatomopatológico de los riñones.

Existen alteraciones, aunque en la escala de valoración estas deben llegar a la escala de dos para que se considere como tal. Hay diferencias significativas a nivel de túbulos. Prueba de Tukey: *Control versus gold estándar, $p < 0,05$ ($n = 7$ por grupo).

Los resultados del análisis de la hemoglobina (Hb), ver figura 6, el promedio del grupo experimental fue 10.33 mg/dl, el del gold estándar fue 11.56 mg/dl y del control 12.56 mg/dl. Se observa que la media de la Hb en el grupo control (13,3mg/dl) es mayor ($p < 0,05$) que la media de la Hb del grupo gold estándar (11,6mg/dl) y la media de la Hb del grupo experimental (10,3mg/dl). Debemos anotar que no se obtuvo un valor inicial de cada grupo.

La concentración de la hemoglobina en el grupo experimental fue menor que el resto de los otros dos grupos, con un promedio de 10,3 mg/dl. El grupo control tuvo una concentración promedio de 3 puntos más, es decir 13,3 mg/dl. En la figura 6 se aprecian muy diferenciados estos promedios.

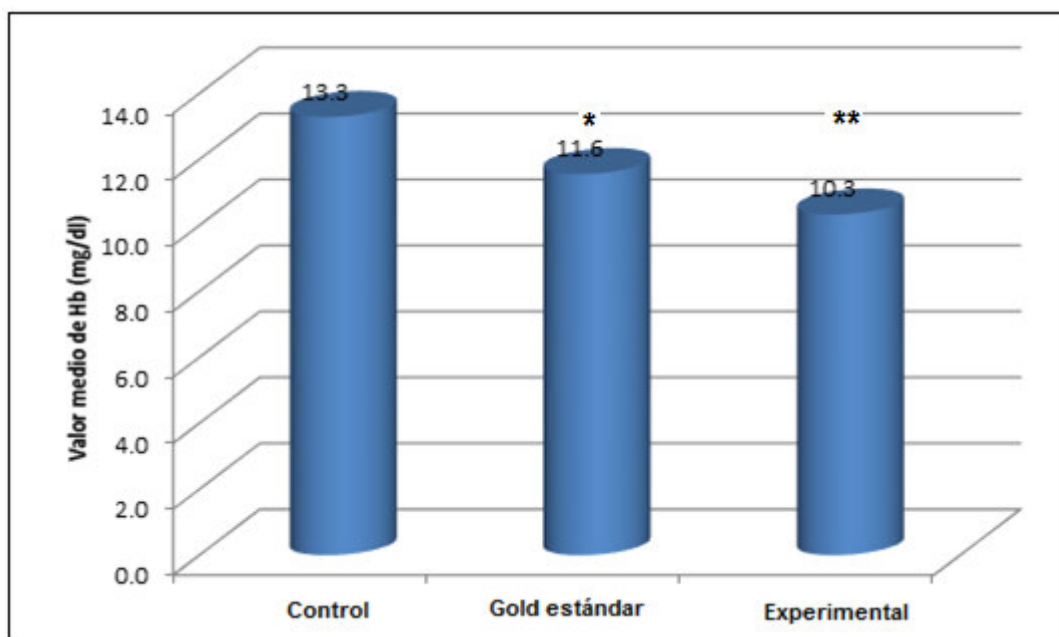


Figura 6. Comparación del valor medio de la hemoglobina (Hb) de los tres grupos. La Hb es ostensiblemente menor en el grupo experimental en referencia al control, aunque el efecto es reversible. Prueba de Tukey: *Control versus gold estándar, $p < 0,05$; gold estándar versus experimental, $p < 0,05$; **control versus experimental, $p < 0,05$ ($n = 7$ por grupo).

4.2. Discusión de resultados

Diversos estudios realizados, entre otros, como el de Szczesny et al. (2014) establece que la concentración intermedia de AP39 (un donador sintetizado de H_2S) fue de 100 nM, el cual redujo el estrés oxidativo intracelular y por ende mantuvo la integridad de las mitocondrias y el ADN, ya que no sufrieron daño. Siguiendo el mismo principio de sintetizar el compuesto, en el presente trabajo se siguió el mismo camino, pero se buscó el indicador importante de la reducción del metabolismo basal, es decir, la reducción del consumo de O_2 y de la producción de CO_2 .

En la figura 1 (ver pág. 23) se aprecian los tres grupos: El experimental y gold estándar partieron con una misma concentración de O_2 (20,6%); el grupo control inició con una concentración de 20,9% de O_2 . Luego de 15 minutos, en una cámara que fue usada para los tres grupos, el grupo experimental consumió menor cantidad de O_2 , esto es debido, como es señalado por diferentes estudios, a que el azufre reemplaza al O_2 como último aceptor de electrones en la producción de ATP y que a su vez modula la demanda de O_2 . El resultado fue significativo ($p < 0,05$) en comparación a los otros dos grupos, ya que el grupo experimental consumió sólo 0,7% de O_2 de la cámara a diferencia del gold estándar que consumió 1,1% y el control 1,9%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Blackstone et al. el 2005, fecha en que realizaron los primeros experimentos de este tipo, aunque trabajaron a diferentes concentraciones de O_2 (20,9% y 10%) en comparación al presente trabajo que fue de 20,6%.

La producción de CO_2 fue menor en el grupo experimental en referencia al grupo control y al gold estándar, teniendo el primer y tercer grupo similar mecanismo de acción. Por ejemplo, en el grupo control la producción de CO_2 fue 15200 ppm; en el grupo experimental fue de 10900 ppm y en el grupo del gold estándar: 27300 ppm. La disminución de la producción de CO_2 por parte del grupo experimental en 4300 ppm respecto al grupo control (expuesto sólo a aire puro) y en 16400 ppm respecto al grupo gold estándar (expuesto a sevoflurano), fue debido a la modulación del metabolismo.

La figura 2 (ver pág. 24) describe una gran diferencia en la producción de CO₂ de los tres grupos, en este caso la menor producción pertenece al grupo experimental con sólo 10900 ppm y luego más elevada el grupo control con 15200 ppm y mucho más elevada fue la producción del gold estándar. Estos indicadores van de acuerdo con lo sostenido por Aslami et al. (2010) entre otros indicadores como por ejemplo: la reducción de los latidos cardíacos, la reducción de la temperatura, que puede llegar a 20 °C en una exposición de H₂S por un tiempo de hasta 6 horas. La exposición del H₂S fue de tan sólo 20 minutos en el presente trabajo por lo que no se esperaría una drástica disminución de la temperatura, aunque los trabajos realizados por Blackstone et al. el 2005 tuvieron una drástica disminución de la temperatura en ratones. Para este tipo de resultados, la masa del animal y su radio tiene mucho significancia en el resultado final.

Los resultados en el cuadro 2 (ver anexo), sobre los estudios anatomopatológicos de los corazones, muestran claramente que los resultados no son significativos ($p > 0,05$). Si nos fijamos en los resultados de las medias y la desviación típica o desviación estándar, los grupos control y experimental muestran los mismos resultados, es decir, sin variación alguna al estudio anatomopatológico por lo que se les asignó un valor igual a cero. Lo contrario al grupo del gold estándar que si mostraron variaciones, pero que sin embargo, no fueron significativos para la parte estadística ya que sólo presentaron alguna leve alteración en el tejido cardíaco de tres *Cavia porcellus*. Zheng et al. (2015) establece que el H₂S es cardioprotector. Zhou et al. (2015) establece que la neutralización de ROS, inhibe las interacciones de células de los leucocitos endoteliales, promoviendo la relajación vascular del músculo liso, reduciendo la muerte celular apoptótica. Los estudios realizados por Snijder et al. (2014) concuerdan con la vasorrelajación y agregan que la reducción de la PA observado en sus estudios está en línea con los hallazgos anteriores que muestran las propiedades vasorrelajantes de H₂S. En ratones, CES-knockout homocigotos y CBS-deficientes heterocigotos, desarrollan la hipertensión, lo que sugiere un rol importante en la producción de H₂S endógeno en la patogénesis de la hipertensión. Además, la administración exógena de H₂S provoca

vasodilatación en modelos experimentales de hipertensión. Un mecanismo propuesto es la activación de los canales de K_{ATP} a través sulfhidración, pero también sugiere que el aumento de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) podría desempeñar un papel en los efectos vasodilatadores de H_2S . Por otra parte, Miao et al (2016) realizaron estudios, recientemente publicado, en ratones normales y en CES-knockout, donde se observó una mejora de la remodelación y función cardíaca, acompañado con la disminución de la mortalidad en ambos tipos de ratones, lo que sugiere una significativa eficacia para el tratamiento de un infarto al miocardio con H_2S . Pero Stein et al. (2012) establece que el H_2S y otros sulfuros tienen margen terapéutico estrecho.

La modulación de la respiración mitocondrial no se podría afirmar con los estudios de este trabajo, pero si se estaría en condiciones de afirmar que el H_2S es inocuo a 80 ± 20 ppm. Elrod et al. (2007) afirma que el H_2S conserva la estructura y función mitocondrial. Las mitocondrias son el lugar central en la regulación de la muerte celular. El trabajo realizado por Meng et al. (2015) muestran resultados similares con respecto a la protección miocárdica pero esta fue realizada por un donador de H_2S , el GYY4137, que suprimió la producción de fibroblastos y colágeno tipo I y III.

Los resultados obtenidos por Aslami et al. (2010) en sus trabajos sobre pulmones dañados por ventilación asistida, establecieron que el H_2S reduce la inflamación que es inducida por un estado de animación suspendida. Meng et al. (2015) refiere que el sulfuro de diallil, un donador de H_2S , atenúa la excesiva producción de colágeno y la expresión de la proteína de matriz extracelular (ECM). Se podría afirmar que los mismos resultados se asemejan a los obtenidos más en el grupo control y el experimental que con el grupo del gold estándar. Sin embargo debemos señalar que a nivel de vasos las diferencias fueron significativas (ver anexo cuadro 3), sobre todo por el resultado mayor obtenido por el grupo control. Ahora bien, el grupo experimental alcanzó a nivel de presencia celular, por lo menos en dos casos, un resultado llamativo y a nivel alveolar un puntaje promedio, este tipo de casos se presentaron en otros tipos de estudios como el de Whiteman et al. (2010) en donde concluye que el efecto del H_2S en los

mecanismos inflamatorios en macrófagos aislados parece ser dependiente en gran medida de la selección de donantes de H_2S , “los fármacos que liberan pequeñas cantidades de H_2S durante un tiempo prolongado parecen ser más eficaces que los fármacos que liberan grandes cantidades de gas durante un tiempo más corto”.

En el cuadro 4 (ver anexo) se aprecia diferencias significativas con respecto a los túbulos del grupo del gold estándar. Los resultados obtenidos se ilustran mejor en la figura 5. El daño glomerular es menor en referencia al gold estándar, pero contrario al daño hallado en los túbulos. Estos resultados tienen semejanza en una oclusión renal inducida en porcinos por Simon et al. (2011), donde se demostró que con el tratamiento previo con sulfuro se atenúa la disfunción y daño glomerular. Algunas revisiones como la de Perna et al. (2012) dan a conocer que el H_2S afecta tanto el túbulo renal y la vasculatura. La administración simultánea de ácido aminooxiacético, un inhibidor de cistationina β -sintasa, y propargilglicina, una inhibidor de la cistationina γ -liasa, pero tampoco de forma independiente, disminuye la tasa de filtración glomerular y la excreción de sodio y potasio; mientras que estos se incrementan mediante la infusión de ya sea H_2S o cisteína.

En la figura 6 se aprecia que el valor medio de Hb es menor en el grupo experimental (10,3 mg/dL) en referencia al control (13,3 mg/dL). Esto podrían tener explicación en las investigaciones realizadas por Collman et al., (2009) en donde establece que la afinidad del H_2S al hemo Fe II han producido reducciones catalíticas de O_2 que es inhibida reversiblemente, además que dos moléculas de H_2S se unen al hierro y pueden estar en una conformación cerrada. Por otra parte, información de SIGMA®, el método de la cianometahemoglobina no produce oxidación de la sulfohemoglobina, que se forma en minutos a la exposición de H_2S . Los resultados supondrían que el H_2S actuó de la misma forma en la hemoglobina de los cuyes, alterando el conteo de las mismas. Debemos agregar que los valores de Hb resultaron indistinto al género, no existiendo distinción entre cuyes machos y hembras de 10 semanas de edad (ver anexo, página 65).

CONCLUSIONES

1. El sulfuro de hidrógeno disminuye el consumo de oxígeno, así como la producción de dióxido de carbono, modulando la demanda de oxígeno y la producción de dióxido de carbono.
2. La exposición al sulfuro de hidrógeno no alteró el tejido cardíaco a los análisis anatomopatológico realizados al corazón; pero si se produjeron leves alteraciones a nivel de tejidos pulmonar y renal
3. La media de la hemoglobina del grupo experimental fue menor en relación al grupo control.

RECOMENDACIONES

1. Al terminar la exposición con sulfuro de hidrógeno en los cuyes, deben ser trasladados, lo más rápidamente posible, a la cámara con aire limpio. En una habitación de regular dimensión, con una o dos personas, el aire debe tener un porcentaje natural de 20,6% de oxígeno.
2. La sustracción de los órganos, para el estudio anatomopatológico, debe ser lo más inmediato posible para evitar obviar los posibles daños que se hubieran producido a la exposición a los gases, ya que como se sabe la molécula de sulfuro de hidrógeno es muy pequeña y se degrada rápidamente.
3. Al practicarse la punción cardiaca en los cuyes, es muy importante manejar la cantidad adecuada del éter etílico impregnado en un paño de algodón, ya que si no hay una regular fuerza cardiaca será imposible sustraer sangre mediante dicha técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aslami, H., Heinen, A., Roelofs, J., Zuurbier, C., Schultz, M., Juffermans, N. (2010). Suspended animation inducer hydrogen sulfide is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med.* 36:1946–1952.
2. Barr, L., Shimizu, Y., Lambert, J., Nicholson, C. and Calvert, J. (2015). Hydrogen sulfide attenuates high fat diet-induced cardiac dysfunction via the suppression of endoplasmic reticulum stress. *Nitric Oxide* 46: 145–156.
3. Bearden, S., Beard, R., Pfau, J. (2010). Extracellular transsulfuration generates hydrogen sulfide from homocysteine and protects endothelium from redox stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299:1568–1576.
5. Blackstone, E., Roth, M. (2007). Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. *SHOCK.* 27(4):370-372.
6. Bos, E., van Goor, H., Joles, J., Whiteman, M. and Leuvenink, H. (2015). Hydrogen sulfide: physiological properties and therapeutic potential in ischaemia. *British Journal of Pharmacology.* 172:1479–1493.
7. Collman, J., Ghosh, S., Dey, A., Decréau, A. (2009). Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation. *PNAS.* 106(52): 22090–22095.
8. Coletta, H., Queiroz, F., Silva, R., Barbosa, F., Aparecida, M., Prisco, C. et al. (2010). Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage. *Nephrol Dial Transplant.* 10.1093/ndt/gfq447.
9. Elrod, J., Calvert, J., Morrison, J., Doeller, J., Kraus, D., Tao, L., et al. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *PNAS.* 104(39):15560–15565.

10. Gade, A., Kang, M., Akbarali, H. (2013). Hydrogen Sulfide as an Allosteric Modulator of ATP-Sensitive Potassium Channels in Colonic Inflammation. *Mol Pharmacol*. 83:294–306.
11. Haouzi P, Bell HJ, Notet V, Bihain B. (2009). Comparison of the metabolic and ventilatory response to hypoxia and H₂S in unsedated mice and rats. *Respir Physiol Neurobiol* 167:316-322.
12. Hu, L., Lu, M., Tiong, Ch., Dawe, G., Hu, H., Bian, J. (2010). Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging Cell*. 9:135–146.
13. Jiang, J., Chan, A., Ali, S., Saha, A., Haushalter, K. Lam W. et al. (2016). Hydrogen Sulfide—Mechanisms of Toxicity and Development of an Antidote. *Scientific Reports*. 6:20831.
14. Koslowki, P., Cragolino, D., Masoli, O. (2001). Viabilidad miocárdica: conceptos fisiopatológicos para el diagnóstico y la selección del tratamiento. *Revista Argentina de Cardiología*, 69(4):427-438.
15. Kubo, S., Doe, I., Kurokawa, Y., Kawabata, A. (2007). Hydrogen Sulfide Causes Relaxation in Mouse Bronchial Smooth Muscle. *J Pharmacol Sci*. 104: 392-396.
16. Li, R., McKinstry, A., Moore, J., Caltagarone, B., Eckenhoff, M., Eckenhoff, R. et al. (2012). Is Hydrogen Sulfide-Induced Suspended Animation General Anesthesia? *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 341:735–742.
17. Massey, V., Edmondson, D. (1970). On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J Biol Chem*. 245:6595-6598.
18. Maxine, B. (1984) *Manual de Patología Clínica en Veterinaria*. México D.F. Editorial LIMUSA.
19. Meng G, Zhu J, Xiao Y, Huang Z, Zhang Y, Tang X, et al.(2015). Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 Protects against Myocardial Fibrosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 15:1-16.

20. Ministerios de Salud. Principales grupos causa defunción registradas por sexo, lista 6/67 Perú. 2000. Lima-Perú. Recuperado de <http://www.minsa.gob.pe/estadisticas/estadisticas/Mortalidad/092000DI00.htm> Acceso 07-06-2014.
21. Miao, L., Xin, X., Xin, H., Shen X. and Zhu, Y. (2016) "Hydrogen Sulfide Recruits Macrophage Migration by Integrin β 1-Src-FAK/Pyk2-Rac Pathway in Myocardial Infarction. Scientific Reports. 6: 22363.
22. Perna, A. and Ingrosso, D. (2012). Low hydrogen sulphide and chronic kidney disease: a dangerous liaison. Nephrol Dial Transplant. 27: 486–493.
23. Perry, M., Hui, C., Whiteman, M., Wood, M., Adcock, L., Kirkham, P. et al. (2013). Hydrogen Sulfide Inhibits Proliferation and Release of IL-8 from Human Airway Smooth Muscle Cells. Europe PMC Funders Group. 45(4): 746-752.
24. Perú. (2000). Congreso de la República. Ley N° 27265: Ley de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. Lima: Congreso de la República. Recuperado de <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/er/cia/Peru%20Ley%20protecc%20animales%20cautiverio%2027265%20del%202000.pdf>
25. Polhemus D, Calvert J, Butler J, Lefer D. (2014). The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in acute myocardial infarction and heart failure. Scientifica. 14:1-8.
26. Qabazard B, Li L, Gruber J, Peh M, Ng L, Kumar S. (2014). H₂S is an endogenous regulator of aging in Caenorhabditis elegans. Antioxidants & redox signaling. 20(16):2621–2630.
27. Ron Banks (1989) The guinea pig: Biology, care, identification, nomenclature, breeding and genetics. Recuperado de <http://netvet.wustl.edu/species/guinea/guinpig.txt>
28. Shen, Y., Shen, Z., Luo, S., Guo, W. and Zhu, Y. (2015). The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From

Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2015, Article ID 925167.

29. Simon, F., Scheuerle, A., Gröger, M., Stahl, B., Wachter, U., Vogt, J. et al. (2011). Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury. *SHOCK*. 35(2): 156-163.

30. Simpson, J. (2012). What are the issues in organ donation in 2012? *British Journal of Anaesthesia* 108 (S1): i3–i6.

31. Snijder, P., Frenay, A., de Boer, R., Pasch, A., Hillebrands, J., Leuvenink H. et al. (2014) Exogenous administration of thiosulfate, a donor of hydrogen sulfide, attenuates angiotensin II-induced heart disease in rats. *British Journal of Pharmacology*. 172: 1494–1504.

32. Sivarajah, A., Collino, M., Yasin, M., Benetti, E., Gallicchio, M., Mazzon, E. et al. (2009). Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *SHOCK*, Vol. 31, No. 3, pp. 267-274.

33. Stein, A., Mao, Z., Morrison, J., Fanucchi, M., Postlethwait, E., Patel, R. et al. (2012). Metabolic and cardiac signaling effects of inhaled hydrogen sulfide and low oxygen in male rats. *Appl Physiol*. 112:1659-1669.

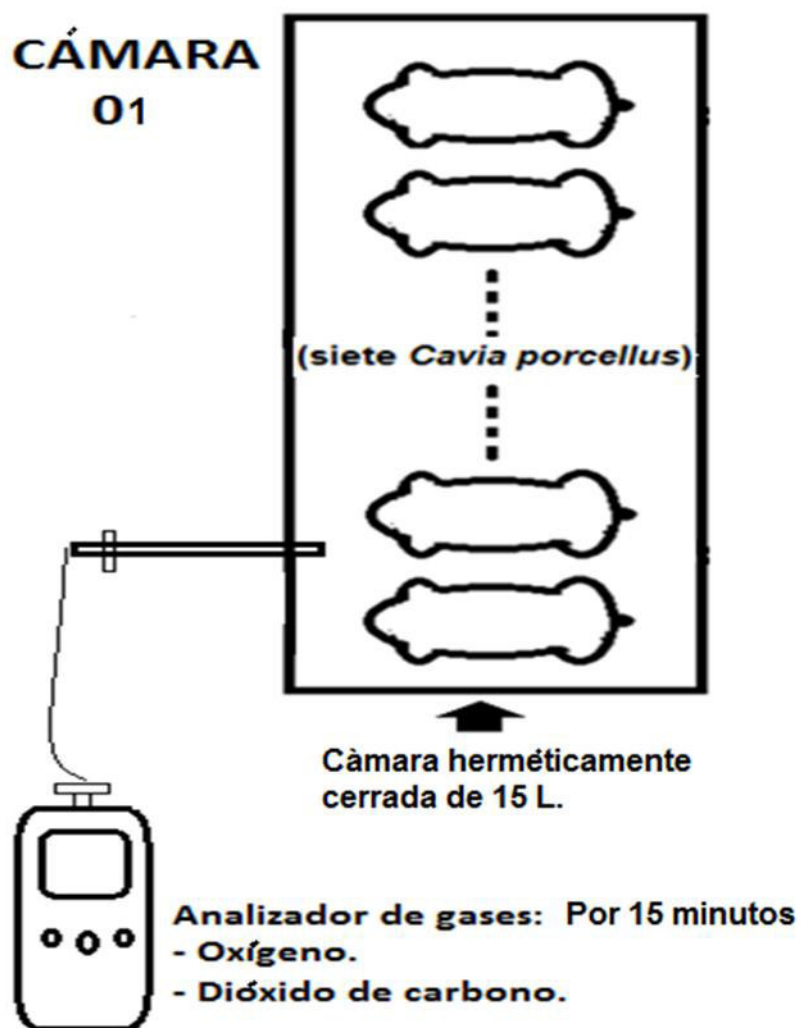
34. Szczesny B, Módis K, Yanagi K, Coletta C, Le Trionnaire S, Wood M. et al. (2014). AP39 [10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl) phenoxy) decyl] triphenyl phosphonium bromide], a mitochondrially targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *NIH*. 41:120–130.

35. Wagner, J. and Manning, P. (1976). *The Biology of the Guinea Pig*. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=1LdqAAAAMAAJ&sitesec=reviews>

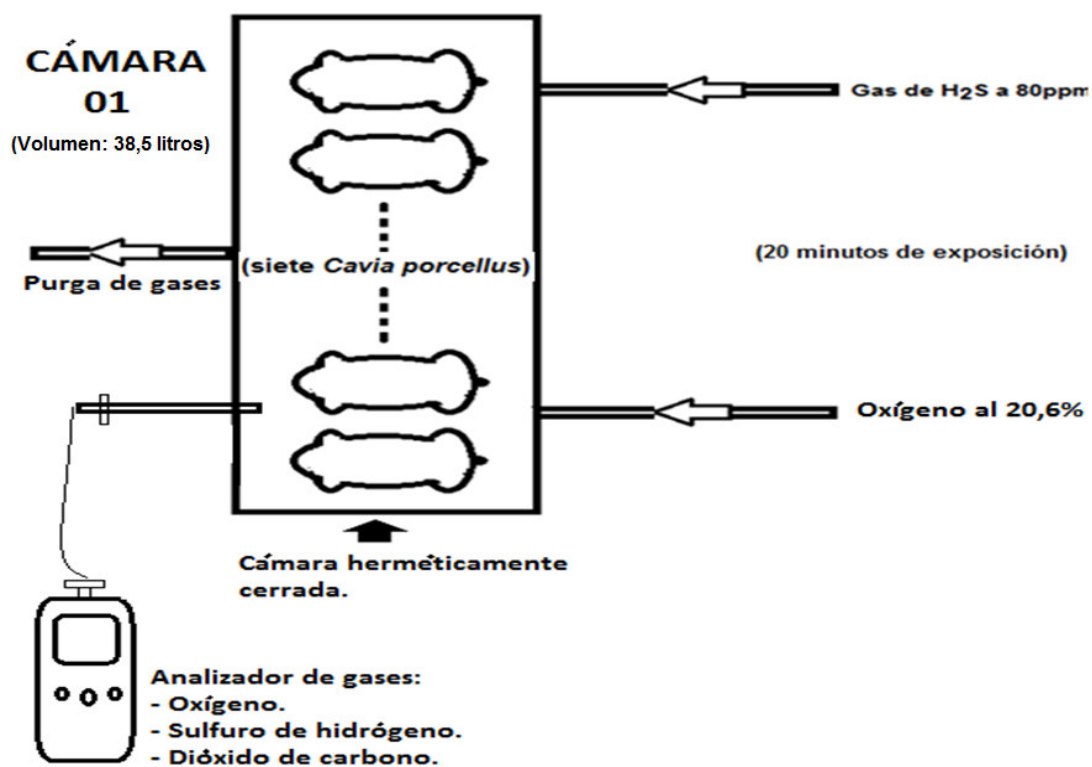
36. Walker, L., Soto, M., Spotorno, A. (2014). Similarities and differences among the chromosomes of the wild guinea pig *Cavia tschudii* and the domestic guinea pig *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae). *CompCytogen* 8(2): 153-167.

37. Wang, R. (2012). Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration that Blossomed. *Physiol Rev.* 92: 791–896.
38. Whiteman, M., Li, L., Rose, P., Tan, C., Parkinson, D. and Moore, P. (2010). The Effect of Hydrogen Sulfide Donors on Lipopolysaccharide-Induced Formation of Inflammatory Mediators in Macrophages. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*.12: 10.
39. Wu, C. (2013). The role of hydrogen sulphide in lung diseases. *Bioscience Horizons*. Volume 6 2013.
40. Wu, D., Wang, J., Li, H., Xue, M., Ji, A. and Li, Y. (2015). Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2015, Article ID 186908.
41. Yuan, J. (2009). Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis*. 14(4): 469–477.
42. Zheng, D., Dong, Sh., Li, T., Yang, F., Yu, X., Wu, J., et al. (2015). Exogenous Hydrogen Sulfide Attenuates Cardiac Fibrosis Through Reactive Oxygen Species Signal Pathways in Experimental Diabetes Mellitus Models. *Cell Physiol Biochem* 36:917-929.
43. Zhou, X., Zhao, L., Mao, J., Huang, J. and Chen, J. (2015) Antioxidant Effects of Hydrogen Sulfide on Left Ventricular Remodeling in Smoking Rats Are Mediated via PI3K/Akt-Dependent Activation of Nrf2. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 144(1): 197–203.

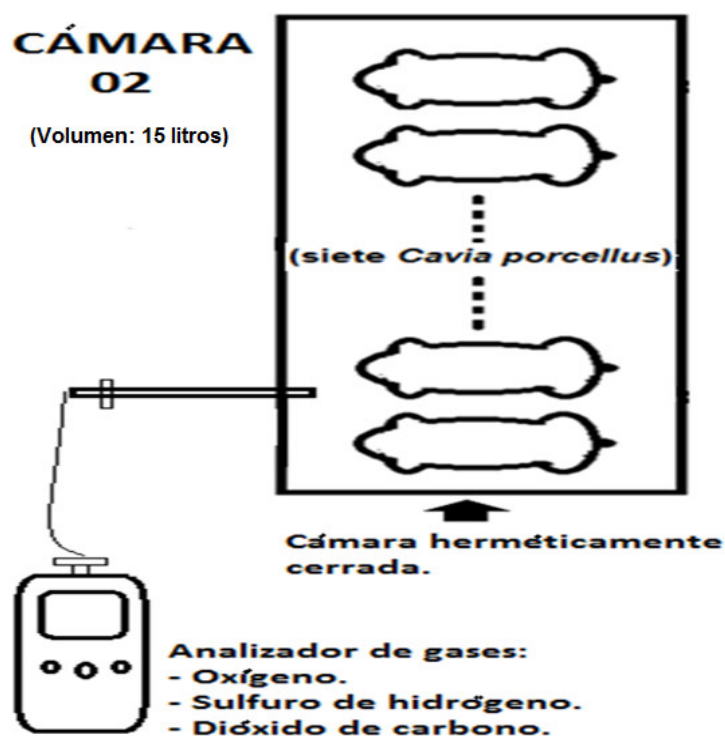
ANEXOS

GRUPO CONTROL (aire limpio)

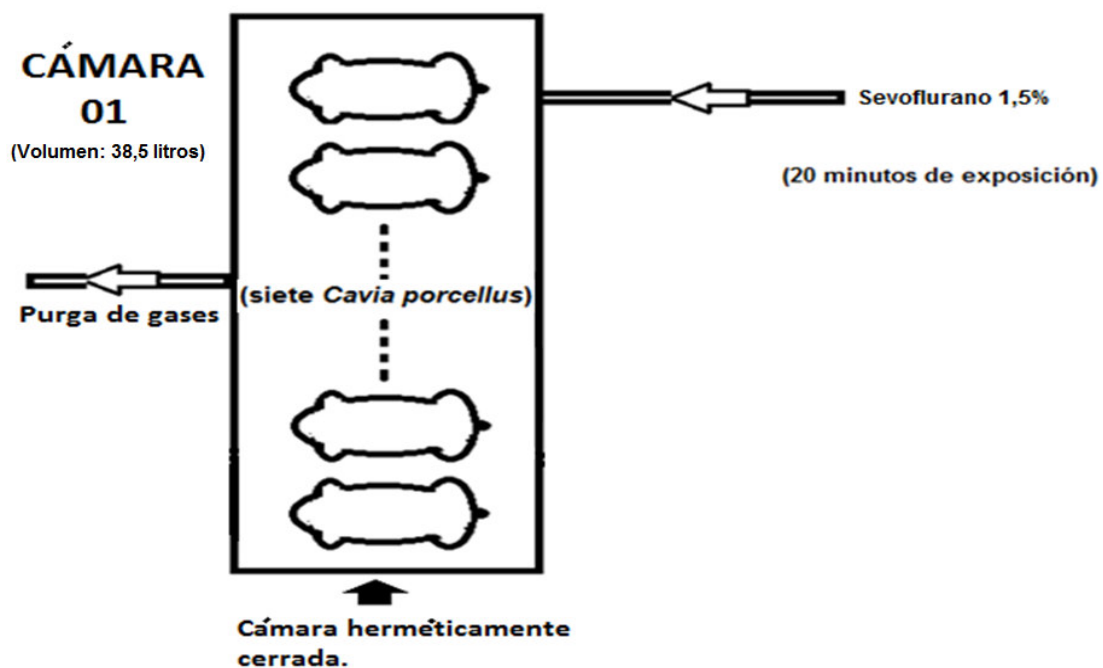
GRUPO EXPERIMENTAL (sulfuro de hidrógeno)



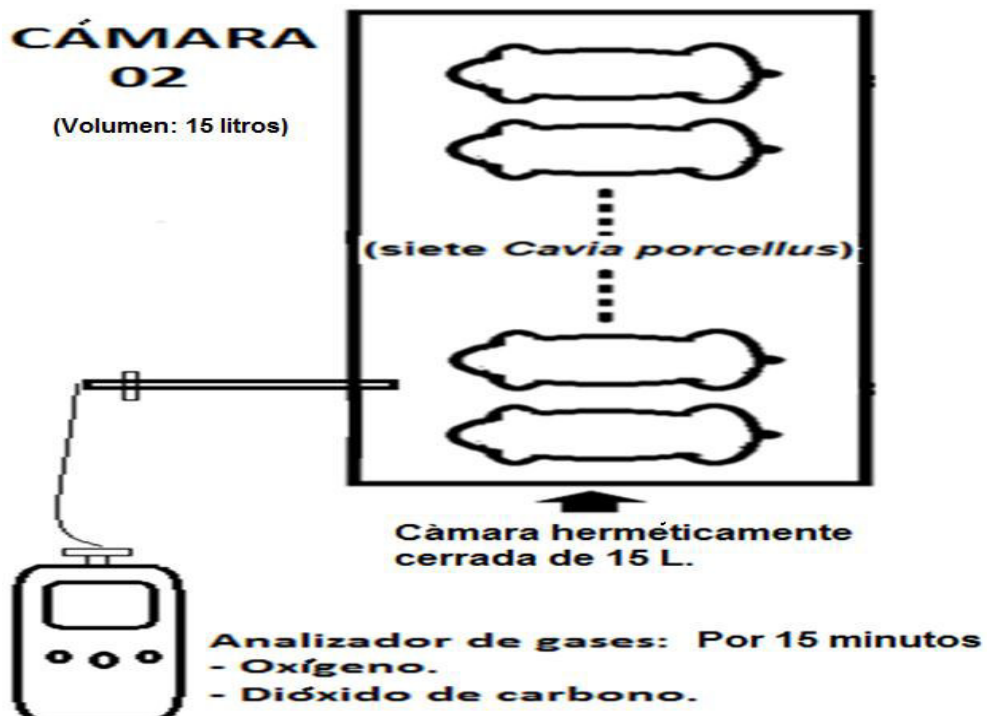
Traslado inmediato
a la cámara 02.



GRUPO GOLD ESTÁNDAR (sevoflurano)



Traslado inmediato
a la cámara 02.



Cuadro 1. Consumo de O₂ y producción de CO₂. Procesos realizados en una cámara de 15 L.

GRUPOS	INICIO		LUEGO DE 15 MINUTOS	
	Oxígeno (%)	Dióxido de carbono (ppm)	Oxígeno (%)	Dióxido de carbono (ppm)
Control	20,9	1100	19,0	15200
Experimental	20,6	2500	19,9	10900
Gold estándar	20,6	100	19,5	27300

Cuadro 2. Medias de los parámetros histológicos del corazón. Los resultados no fueron significativos.

Grupo Experimental (n = 7)		Media ± DS
Estructura corazón	Control	0
	Gold estándar	0,1 ± 0,4
	Experimental	0
Endocardio	Control	0
	Gold estándar	0,3 ± 0,8
	Experimental	0
Miocardio	Control	0
	Gold estándar	0,1 ± 0,4
	Experimental	0
Pericardio	Control	0
	Gold estándar	0,4 ± 0,8
	Experimental	0

p>0,05.

Cuadro 3. Medias de los parámetros histológicos del pulmón. Sólo los vasos del control dieron resultados significativos a la prueba de Tukey.

Grupo experimental (n = 7)*		Media \pm DS	ANOVA P
Estructura pulmón	Control	0,4 \pm 0,8	0,43
	Gold estándar	1,0 \pm 0,8	
	Experimental	1,0 \pm 1,2	
Bronquios	Control	0,4 \pm 0,8	0,06
	Gold estándar	1,7 \pm 1,1	
	Experimental	0,6 \pm 1,0	
Alveolos	Control	1,2 \pm 1,6	0,18
	Gold estándar	2,4 \pm 1,0	
	Experimental	1,1 \pm 1,6	
Vasos	Control	0,6 \pm 1,0	0,02**
	Gold estándar	1,9 \pm 0,7	
	Experimental	0,6 \pm 1,0	
Célula	Control	0,7 \pm 1,3	0,23
	Gold estándar	2,1 \pm 1,3	
	Experimental	1,1 \pm 2,0	

*Prueba de Tukey. **p<0,05. Pareadas: Control versus Gold estándar, p<0,05; gold estándar versus experimental, p<0,05.

Cuadro 4. Medias de los parámetros histológicos del riñón. Sólo las medias de los túbulos del control resultaron significativas.

	Grupo experimental (n = 7)*	Media ± DS	ANOVA P
Estructura riñón	Control	0,4 ± 1,1	0,12
	Gold estándar	1,6 ± 1,1	
	Experimental	0,4 ± 1,1	
Corteza	Control	0,6 ± 1,1	0,17
	Gold estándar	1,6 ± 0,8	
	Experimental	0,7 ± 1,1	
Glomérulos	Control	1,4 ± 0,5	0,06
	Gold estándar	2,6 ± 1,3	
	Experimental	2,6 ± 0,8	
Túbulos	Control	0,7 ± 1,0	0,02**
	Gold estándar	2,6 ± 0,8	
	Experimental	1,1 ± 1,6	
Túbulos proximal	Control	0,6 ± 0,8	0,13
	Gold estándar	0,0 ± 0,0	
	Experimental	1,0 ± 1,3	
Túbulos descendentes	Control	0,6 ± 0,8	0,16
	Gold estándar	0,3 ± 0,8	
	Experimental	1,3 ± 1,3	
Intersticio	Control	0,9 ± 1,2	0,2
	Gold estándar	2,0 ± 0,8	
	Experimental	1,1 ± 1,5	

*Prueba de Tukey. **p<0,05 ANOVA. Pareadas: Control versus gold estándar, p<0,05.

Cuadro 5. Comparaciones de las medias de hemoglobina de los tres grupos.

Hemoglobina (n = 7) *	Media \pm DS	ANOVA P
Control	13,3 \pm 0,7	0,000+
Gold estándar	11,6 \pm 0,5	0,000+
Experimental	10,3 \pm 0,3	0,000+

*Prueba de Tukey. Pareadas: Control versus gold estándar, $p < 0,05$; gold estándar versus experimental, $p < 0,05$; control versus experimental, $p < 0,05$.



Figura 7. **Grupo Experimental, inicio de lectura de O₂ y CO₂ por 15 minutos.**
(Inicia a 20.6 % de O₂). Fuente propia.



Figura 8. **Grupo Experimental, final de lectura de lectura de O₂ y CO₂ luego de 15 minutos.** Se obtuvieron las lecturas: porcentaje de O₂ igual a 19.9% y de CO₂ igual a 10900 ppm. Fuente propia.

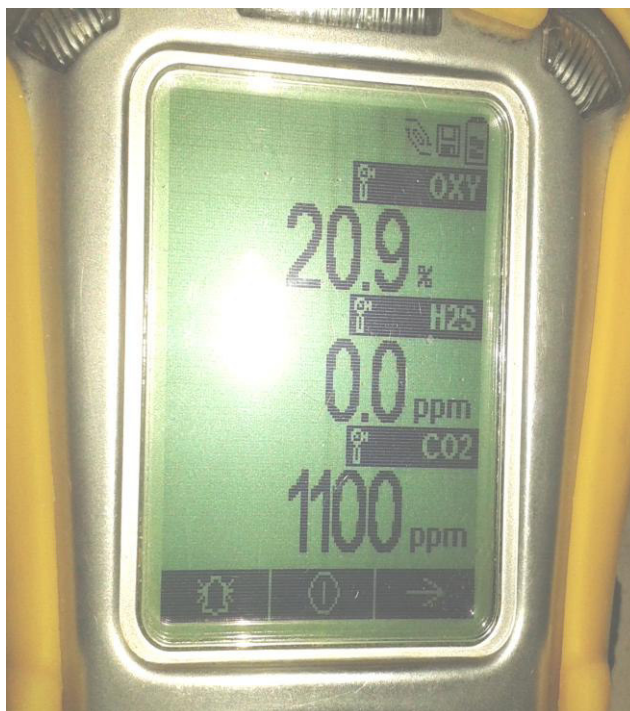


Figura 9. **Grupo Control, inicio de lectura de los 15 minutos.** Vemos O₂ en 20.9% y CO₂ con 1100 ppm. Fuente propia.

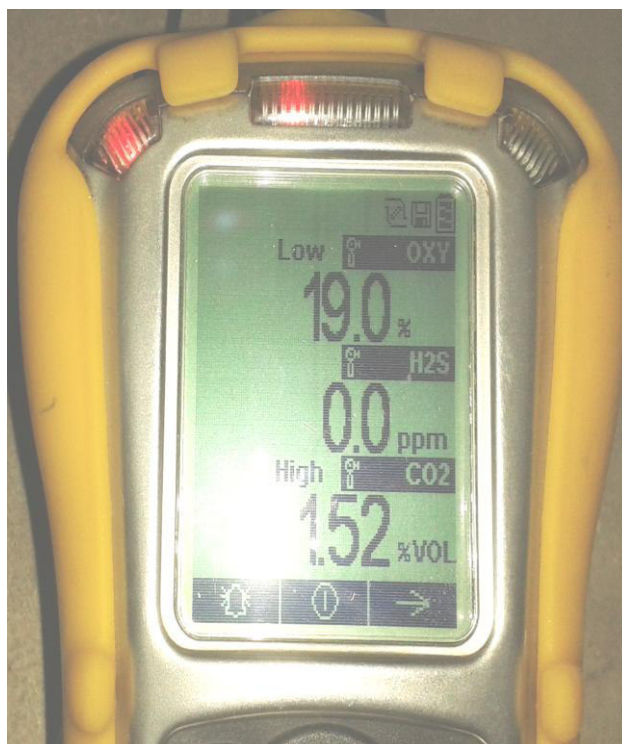


Figura 10. **Grupo Control, final de lectura luego de 15 minutos.** El analizador marca 19% de O₂ y 15200 de CO₂. Fuente propia.



Figura 11. Grupo Gold estándar, inicio de lectura de O₂ y CO₂ por 15 minutos. La lectura de O₂ empieza con 20.6% de y la lectura de CO₂ con 100 ppm. Fuente propia.



Figura 12. Grupo Gold estándar, final de lectura de CO₂ luego de 15 minutos. Se obtuvo una lectura de 27300 ppm de CO₂. Fuente propia.



Figura 13. Grupo Gold estándar, final de lectura de O₂ luego de 15 minutos.

Se obtuvo una lectura final de 19.5% de O₂. Fuente propia.



Figura 14. Concentración de H₂S a la exposición en cuyes (tratamiento). Se muestra, entre otros indicadores, el H₂S a 99,9 ppm. Si bien empezó con un indicador de 80 ppm estas oscilaron a entre 60 y 99,9 ppm. Es decir la concentración de H₂S en la experimentación fue de 80 ± 20 ppm de H₂S. Fuente propia

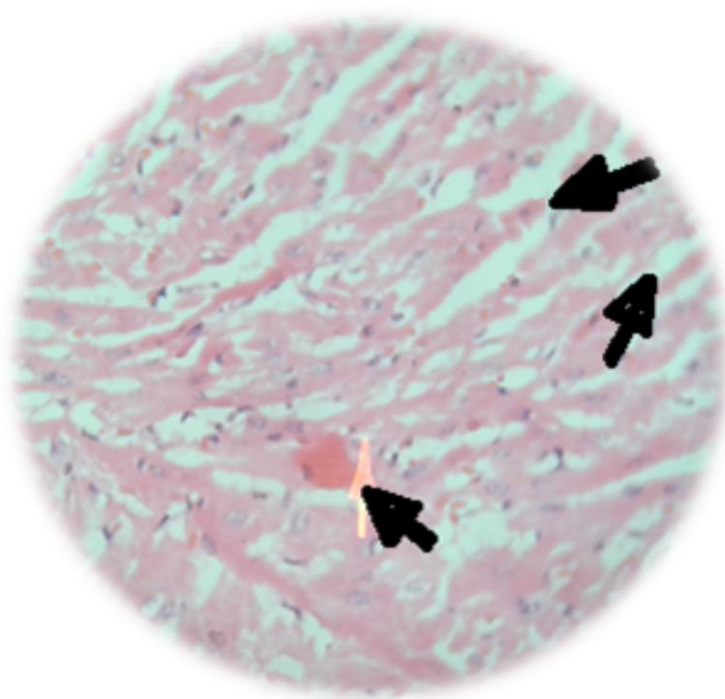


Figura 15. Grupo Gold estándar, miocardio expuesto a sevoflurano. Las flechas en orden descendente indican: Pérdida de núcleos, separación excesiva de haces musculares y congestión.

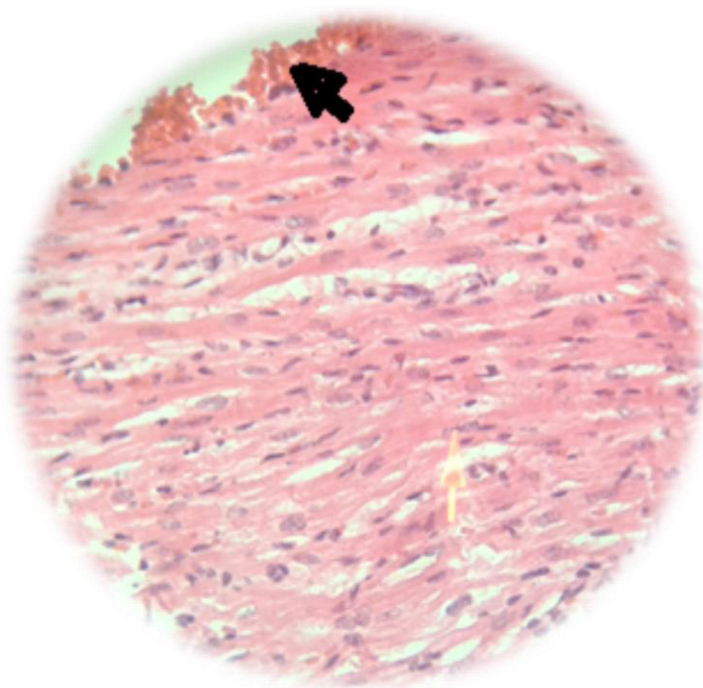


Figura 16. Grupo Gold estándar, pericardio expuesto a sevoflurano. La flecha negra señala discreta congestión.

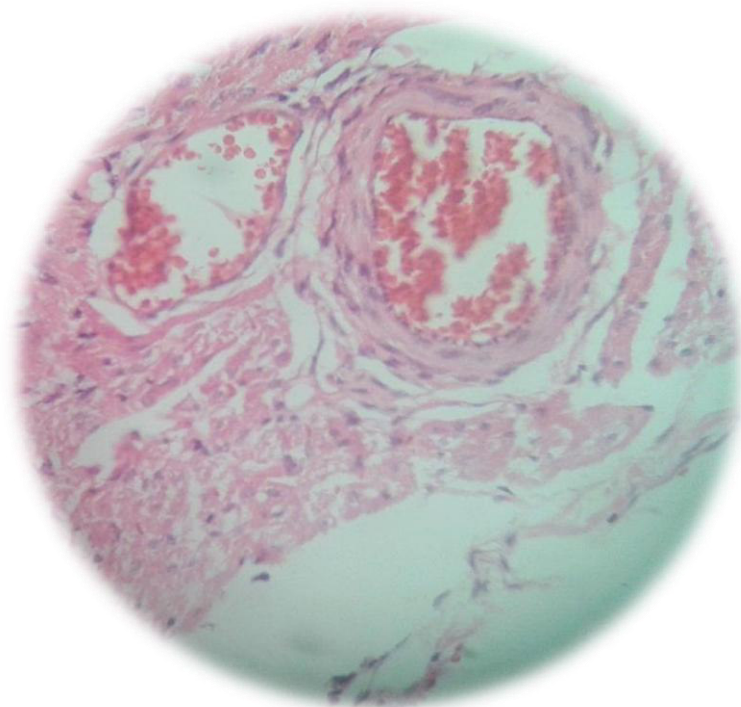


Figura 17. Grupo Gold estándar, pericardio expuesto a sevoflurano.
Leve alteración con gran aumento de linfocitos.



Figura 18. Monitor y vaporizador de anestesia. En la Unidad de Cirugía Experimental del INSN. Fuente propia.



Figura 19. Camilla de cirugía de la Unidad de Cirugía Experimental del INSN. El médico anestesiólogo, César Rojas, verificando la administración de sevoflurano a los cuyes. Se observa la cámara de 38,4 litros. Fuente propia.



Figura 20. Extracción de órganos. Previamente practicada la eutanasia luego de la punción cardíaca, se procedió a extraer los órganos requeridos. Fuente propia.



Figura 21. Unidad de Cirugía Experimental del INSN. Fuente propia.

PROCEDIMIENTO DEL GRUPO EXPERIMENTAL

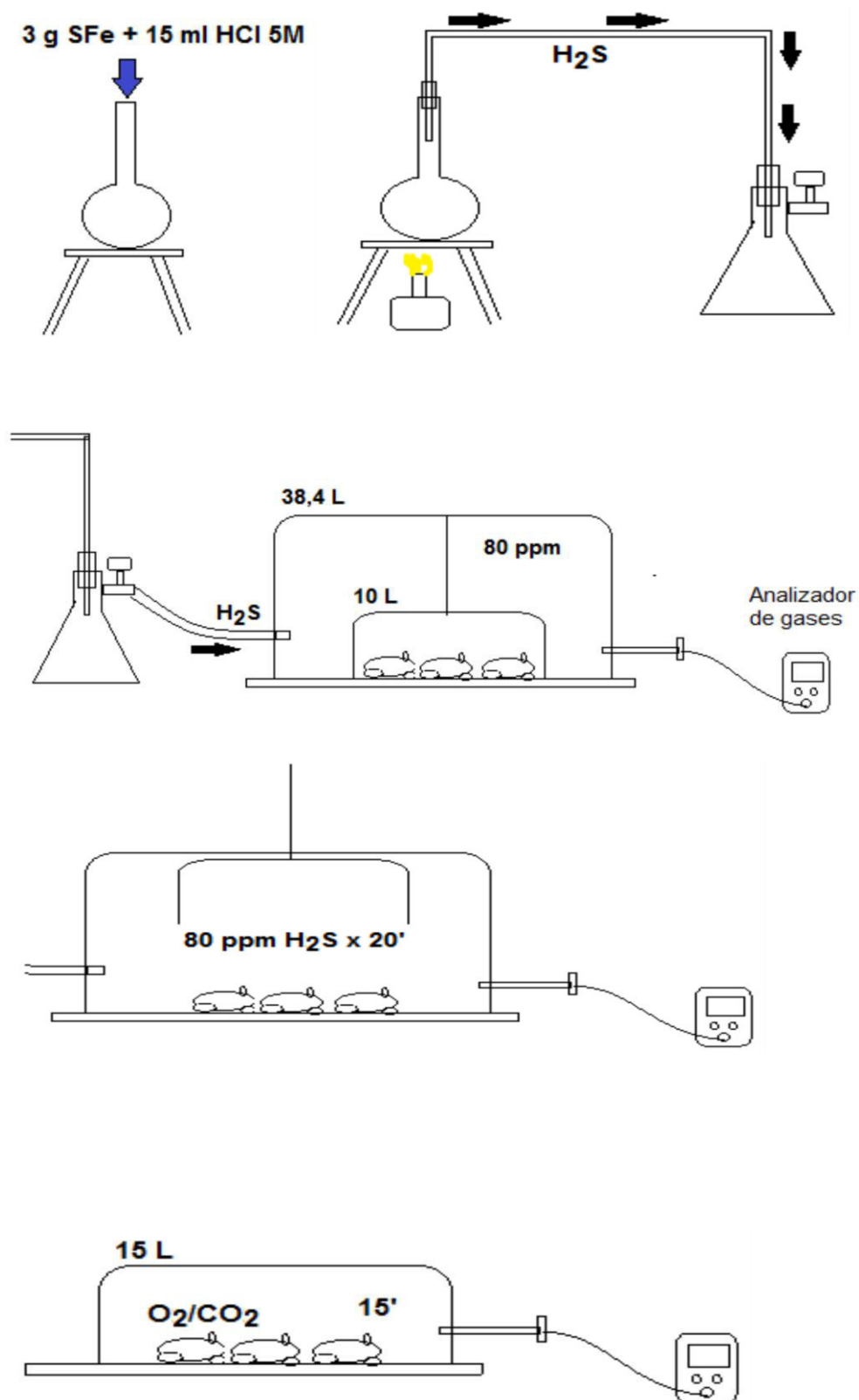


Figura 22. Procedimiento para el grupo experimental.



Figura 23. **Analizador de gases.** Adjunto al analizador se observa la sonda, esta sirve para medir los gases de un ambientes aislado. Fuente propia.



Figura 24. **Síntesis de sulfuro de hidrógeno.** Luego de mezclar el FeS con HCl 5 M se procedió a cerrar el matraz de fondo redondo, de ella sale una cánula que va al matraz kitasato que va almacenar el H_2S . Fuente propia.



Figura 25. Detalle del matraz de fondo redondo. La mezcla de FeS y HCl 5 M se calienta ligeramente, sólo mediante este procedimiento va a liberar H_2S aceleradamente. Fuente propia.



*Figura 26. **Detalle del matraz kitasato.** Mediante una cánula se hace llegar el H_2S al matraz kitasato para almacenarla, a esta se ha adaptado una llave para liberar el gas a requerimiento. Fuente propia.*



*Figura 27. **Cámara de tratamiento de 38,4 litros.** Se observa la cámara de polipropileno del cual sobresale un tira de nylon que es la que retira la cámara de protección de los cuyes antes de exponerlos a 80 ± 20 ppm de H_2S . Se observa parte del analizador de gases en la parte superior y en la parte inferior izquierda la cánula que conduce el gas de H_2S . En la parte superior izquierda el tubo de color rojo sirve para el desfogue del gas. Fuente propia.*



Figura 28. Cámara en detalle. Se observan los cuyes a la exposición de H_2S a la vez que se observa el analizador de gases que arroja la concentración del mismo. Fuente propia.



Figura 29. Cámara de 15 litros. Esta cámara de polipropileno se usó para medir el consumo de O_2 y producción de CO_2 . Se observa la sonda del analizador de gases conectada a la cámara. Fuente propia.

OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA	ESCALA	VALOR FINAL
Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S) (V.I.)	Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S), aunque conocido como un tóxico industrial y ambiental, se reconoce ahora como una importante molécula de señalización fisiológica en los mamíferos (Aslami, et al., 2010)	H ₂ S se obtendrá por la reacción química de Galena con HCl. Tratamiento previo con H ₂ S a 80 ppm y O ₂ a 20.6%, esto hace que el H ₂ S sea inhalado sin mayor peligro por el <i>Cavia porcellus</i> .	-	Olor similar a huevo podrido, cuando está a poca concentración. Altas concentraciones sólo es medible por un analizador de gases.	ppm	0 – 100ppm	80ppm
Metabolismo basal (V.D.)	Cantidad de calor expresada en calorías producida en una hora (Vidal, A.)	Al generar enlentecimiento funcional orgánico, los indicadores del metabolismo basal disminuyen	Anabolismo-catabolismo	Consumo de O ₂ . Producción de CO ₂ .	-Porcentaje (%). - Partes por millón (ppm).	- De 0% a 100%. - De 0 ppm a 20000 ppm.	- O ₂ : 19,9 % - CO ₂ : 10900 ppm

Matriz de consistencia

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL		POBLACIÓN	METODOLOGÍA
¿El sulfuro de hidrógeno será modulador del metabolismo basal en <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales?	Evaluar el efecto del sulfuro de hidrógeno como modulador del metabolismo basal de <i>Cavia porcellus</i> normales.	El metabolismo basal de <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales es modulado por el sulfuro de hidrógeno.		Población: <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales machos y hembras. Muestra: 21 <i>Cavia porcellus</i> (Cuy).	La investigación es de tipo cuasi-experimental. Acondicionamiento: 05 días. Se asignará un número a cada animal, se pesará, se randomizará.
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES DE HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	Divididos en tres grupos de siete miembros cada uno:	1. Mediante un analizador de gases se obtendrá el consumo de O ₂ y producción de CO ₂ .
1. ¿Cuál será el resultado del consumo de O ₂ del <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales luego de la exposición a H ₂ S?	1. Medir el consumo de O ₂ del <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales luego de la exposición a H ₂ S.	- El metabolismo basal de <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales disminuye por efecto de la exposición al sulfuro de hidrógeno.	-Metabolismo basal. -Sulfuro de hidrógeno. -Sulfuro de hidrógeno endógeno.	1. Grupo experimental (GE).	2. Se procederá a la exposición de 07 cobayos, dentro de una cámara herméticamente cerrada, a: H ₂ S a 80 ppm y O ₂ a 20.6% por 20 minutos.
2. ¿Cuál será la producción de CO ₂ del <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) luego de la exposición a H ₂ S?	2. Medir la producción del CO ₂ del <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales luego de la exposición a H ₂ S.			2. Grupo no experimental (GNE).	3. Luego se procederá a pasar a los 07 cobayos a otra cámara herméticamente cerrada con 20.9 % de O ₂ por 15 minutos para observar, mediante un analizador de gases, el consumo de O ₂ y producción de CO ₂ .
3. ¿Qué tipo de cambios histológicos a nivel pulmonar, cardíaco y renal presentará el <i>Cavia porcellus</i> (Cuy)?	3. Analizar los posibles cambios histológicos a nivel de tejido pulmonar, cardíaco y renal en <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales luego de la exposición al H ₂ S.	- Sulfuro de hidrógeno es un agente depresor del metabolismo de <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales.		3. Grupo no experimental más gold estándar. (GNE + GS)	4. Se extraerá, mediante punción cardíaca, sangre del cuy para analizar la hemoglobina y compararla con el control.
4.- ¿Cuál será los niveles de hemoglobina que presenten los tres grupos luego del estudio?	4. Evaluar los niveles de hemoglobina en <i>Cavia porcellus</i> (Cuy) normales luego de la exposición a H ₂ S.			PARTE ÈTICA	5. Luego se sacrificará a los cuyes para extraer: pulmón, corazón y riñón.
				Se cumplirá las normas establecidas por el Comité de Ética Institucional para el buen trato y manejo de los animales de experimentación.	6. Para el gold estándar se procederá de la misma forma. Para el análisis estadístico prueba de Tukey, SPSS 21.

Tabla general de valores obtenidos de la experimentación.

		T = 0'	T = 15'	T = 0'	T = 15'	SANG RE	CORAZÓN				PULMÓN					RIÑÓN				
Nº total	DESCRIPCIÓN	O ₂ %	O ₂ %	CO ₂ ppm	CO ₂ ppm	Hb mg/dl	Estructura	Endocardio	Miocardio	Pericardio	Estructura	Bronquios	Alveolos	Vasos	Células	Estructura	Corteza	Glomerulos	Túbulo	Intersticio
1	Control	20,9	19	1100	15200	13,6 ^M	0	0	0	0	0	2	1	2	2	3	3	2	2	3
2	Control	20,9	19	1100	15200	12,4 ^M	0	0	0	0	0	0	4	2	3	0	0	1	1	0
3	Control	20,9	19	1100	15200	13,2 ^H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1
4	Control	20,9	19	1100	15200	13,9 ^H	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	2
5	Control	20,9	19	1100	15200	13,1 ^H	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	2	2	0
6	Control	20,9	19	1100	15200	14,2 ^H	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0
7	Control	20,9	19	1100	15200	12,6 ^H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
8	Sevoflurano	20,6	19,5	100	27300	10,7 ^H	0	0	1	2	2	2	3	2	3	2	1	2	2	2
9	Sevoflurano	20,6	19,5	100	27300	11,3 ^H	1	2	0	0	2	3	4	2	4	3	2	0	4	3
10	Sevoflurano	20,6	19,5	100	27300	12,1 ^M	0	0	0	1	0	1	2	1	1	2	2	3	2	3
11	Sevoflurano	20,6	19,5	100	27300	14,4 ^H	0	0	0	0	1	3	3	3	3	2	1	2	2	1
12	Sevoflurano	20,6	19,5	100	27300	11,6 ^H	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	3	1
13	Sevoflurano	20,6	19,5	100	27300	11,5 ^M	0	0	0	0	1	2	2	1	2	2	3	2	2	2
14	Sevoflurano	20,6	19,5	100	27300	12,3 ^H	0	0	0	0	1	2	2	2	2	0	1	2	3	1
15	Sulfuro de H.	20,6	19,9	2500	10900	10,4 ^H	0	0	0	0	0	2	2	2	4	3	3	3	0	3
16	Sulfuro de H.	20,6	19,9	2500	10900	10,5 ^M	0	0	0	0	1	0	4	2	4	0	0	2	0	0
17	Sulfuro de H.	20,6	19,9	2500	10900	10,6 ^H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	2	2
18	Sulfuro de H.	20,6	19,9	2500	10900	10,1 ^H	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3
19	Sulfuro de H.	20,6	19,9	2500	10900	10,5 ^H	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	2	4	0
20	Sulfuro de H.	20,6	19,9	2500	10900	9,8 ^M	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
21	Sulfuro de H.	20,6	19,9	2500	10900	10,4 ^H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0

^H: Hembra, ^M: Macho. 0 = sin lesión; 1 = Conservado; 2 = moderada alteración; 3 = alterado; 4 = muy alterado.